

**Identifikation von Genen mit dem Potential zur  
Transformation von präkanzerösen Läsionen (Dysplasie)  
zu malignen Lebertumoren in einem transgenen  
Mausmodell**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz  
Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biol. Danele Weinz (geb. Hunecke)  
geboren am 09.01.1980 in Bünde

2017

**Identifikation von Genen mit dem Potential zur Transformation von präkanzerösen Läsionen (Dysplasie) zu malignen Lebertumoren in einem transgenen Mausmodell**

**Referent:**

Prof. Dr. Jürgen Borlak  
Institut für Pharmako- und Toxikogenomikforschung  
Carl-Neuberg-Str. 1  
30625 Hannover

**Korreferent:**

Prof. Dr. rer. nat. Hans-Jörg Jacobsen  
Institut für Pflanzengenetik  
Herrenhäuser Str. 2  
30419 Hannover

**Korreferent:**

Prof. Dr. rer. nat. Jens Boch  
Institut für Pflanzengenetik  
Herrenhäuser Str. 2  
30419 Hannover

**Tag der Promotion:** 29.03.2017

Die experimentellen Versuche der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von 2007 bis 2010 am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Jürgen Borlak in der Abteilung für Molekulare Medizin und Medizinische Biotechnologie angefertigt.

Meinen Kindern Clemens und Hagen

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	
1.1 Abstract/ Conclusion .....	16
1.2 Zusammenfassung .....	17
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Die Leber</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion .....	21
2.1.2 Aufbau der Leber im Detail.....	22
2.1.3 Leberkrebs.....	24
2.1.4 Risikofaktoren für Leberkrebs.....	25
<b>2.2 Klassifikation der Dysplasie und des HCC</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3 Regulation der Genexpression in Eukaryoten</b> .....	<b>29</b>
2.3.1 Transkription .....	30
2.3.2 Processing .....	30
2.3.3 Capping.....	31
2.3.4 Polyadenylierung .....	31
2.3.5 Spleißen.....	34
2.3.5.1 Grundlegende Mechanismen und deren Regulation .....	34
2.3.5.2 Alternatives Spleißen im HCC.....	37
<b>2.4 „MYC“</b> .....	<b>38</b>
2.4.1 Das Protoonkogen c-Myc .....	38
2.4.2 Struktur und Funktion .....	39
2.4.3 Regulation von „MYC“ .....	43
2.4.4 Bedeutung von „MYC“ in der Karzinogenese.....	44
<b>2.5 Thematische Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>45</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>47</b>
3.1.1 Chemikalien und Kits.....	47
3.1.2 Radioaktive Isotope .....	51
3.1.3 Antikörper .....	51
3.1.4 Oligonukleotide .....	52
3.1.4.1 EMSA-Oligos.....	52
3.1.4.2 PCR-Primer.....	53
3.1.5 Versuchstiere.....	58

## Inhaltsverzeichnis

3.1.6 Verbrauchsmaterial.....	59
3.1.7 Geräte.....	60
3.1.8 Verwendete Software und Onlineprogramme .....	61
3.1.9 Zelllinie .....	62
<b>3.2 Methoden</b>	
3.2.1 Zellkultur .....	62
3.2.2 Histologie .....	66
3.2.3 RNA Analyse .....	67
3.2.4 DNA Analyse .....	68
3.2.5 Protein Analyse .....	74
3.2.6 Microarray Analyse.....	80
3.2.7 TRANSFAC® und MATCH™ Tool .....	97
3.2.8 HMMgene (v.1.1) Analyse Programm des CBS (Center for Biological Sequence Analysis) .....	98
3.2.9 Panther Gene Ontologie Analyse .....	98
<b>4. Experimente und Ergebnisse.....</b>	<b>99</b>
4.1 Transgenes Mausmodell und humane Zelllinie.....	99
4.2 Histologie .....	100
4.3 Mikroarray Experimente.....	102
4.3.1 3'UT Array.....	102
4.3.2 Exon Array .....	103
4.3.3 ArrayTrack software und XRAY Biotique .....	108
4.3.4 PCR-Analyse auf alternatives Spleißen .....	115
4.3.5 Gene Ontologie (GO) Analyse .....	116
4.3.6 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) .....	120
4.4 TRANSFAC® / MATCH.....	147
4.4.1 Analyse der signifikanten Gene auf myc-TFs Bindestellen..	147
4.5 EMSA Analyse der möglichen Myc-Target Gene .....	149
4.6 qRT-PCR Analyse .....	152
4.7 Zellzyklusanalyse.....	157
4.8 Western Blot Analyse .....	159
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>167</b>
5.1 Exon Arrays .....	167
5.1.1 Hierarchische Cluster .....	168
5.2 MATCH .....	169
5.3 RT-PCR.....	169

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>5.4 Myc und die Zellzyklusregulation .....</b>	<b>172</b>
<b>5.5 Die Bedeutung von Myc in der Karzinogenese .....</b>	<b>179</b>
<b>5.6 Durch Myc kontrolliertes mRNS-Spleißen .....</b>	<b>188</b>
<b>5.6.1 Analyse auf alternative Spleiß Ereignisse .....</b>	<b>189</b>
<b>5.7 Analyse der Gene Ontologie.....</b>	<b>194</b>
<b>6. Ausblick.....</b>	<b>195</b>
<b>7. Literatur .....</b>	<b>196</b>
<b>8. Anhang</b>	
<b>Verwendete Puffer .....</b>	<b>213</b>
<b>Tabelle zu Transkriptionsraten .....</b>	<b>217</b>
<b>Abbildung mit allen signifikant regulierten Genen die den Zellzyklus betreffen für zwei und sechs Monate alte Aat-Myc transgene Mäuse .....</b>	<b>218</b>
<b>Alle signifikanten Genlisten .....</b>	<b>219</b>
<b>Alle Sequenzen der Sequenzierungen .....</b>	<b>252</b>
<b>Beispiel zur Berechnung der Shiftsonden .....</b>	<b>268</b>
<b>HMMgene Ergebnisse für Arnt2 und Btbd1 .....</b>	<b>269</b>
<b>IPA Glucocorticoid Receptor Signaling Pathway für sechs und zwölf Monate alte Aat-Myc transgene Mäuse .....</b>	<b>271</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>273</b>
<b>Wissenschaftliche Publikationen.....</b>	<b>274</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>275</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<sup>32</sup> P	radioaktives Phosphor-Isotop
Abb.	Abbildung
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides</i>
BLAT	<i>BLAST-like alignment tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Cdc2a	cyclin-dependent kinase 1 (jetzt Cdk1)
cDNA	(engl.) komplementäre DNS
cmp	<i>counts per minute</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cRNS	durch RNA-Synthese aus cDNS erzeugte RNS (Coding RNA)
D	Dysplasie
DF	(engl.) Dysplastischer Herd
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eigel Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dysplastischer Knoten
DN-HG	Dysplastische Knoten - high grade
DN-LG	Dysplastische Knoten - low grade
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Exon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtBr	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HCL	Salzsäure
RT	Raumtemperatur (entspricht 21°C)
FACS	fluorescence-activated cell sorting / Durchflusszytometrie
FC	Fold Change
FCS	Fötalem Kälberserum / foetal calf serum
FL2-A	Floureszenzsignal
FNH	Fokale noduläre Hyperplasien
fwd/F	forward
g	Gramm bzw. Relative Zentrifugalbeschleunigung( $g = 1.12 \times R \times$ (rpm/1000) <sup>2</sup> )
GCOS	GeneChip Operating Software
GR	Glucocorticoid receptor (jetzt NR3C1 Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member1)
h	(engl.) Stunden
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCA	<i>hierarchical gene cluster analysis</i>
HCV	Hepatitis-C-Virus
HNF3a	<i>Forkhead Box A1</i> (jetzt FoxA1)
HNF3b	<i>Forkhead Box A2</i> (jetzt FoxA2)

## Abkürzungsverzeichnis

HNF3g	<i>Forkhead Box A3</i> (jetzt FoxA3)
HNF6	<i>one cut domain, family member 1</i> (jetzt Onecut1)
hnRNA	<i>heteronucleic RNA</i>
HRP	(engl.) Meerrettichperoxidase
hu	Human / homo sapiens
IgG	Immunglobulin G
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
K	Kontrolle
KE	Kernextrakt
konz.	Konzentration [ng/ml]
LCA	<i>Liver Cell Adenom</i>
LCD	<i>liver cell dysplasia</i>
m	Maus / mus musculus
M	Molar (mol/Liter)
MA	Microarray
mA	Milliampere
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
min	Minuten
MM	<i>miss match</i>
mRNS	<i>messenger RNA</i>
mSv/a	Millisievert pro Jahr
mut	mutiert
Myc	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
Na	Natrium
NaAc	Natrium Acetat
NaCl	Natriumchlorid
nc	(engl.) keine Veränderung
Nol5a	<i>NOP56 ribonucleoprotein</i> (jetzt Nop56)
nr	nicht-transgen
Oligos	DNS Oligonukleotide
PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	(engl.) Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	(engl.) Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwertes der Wasserstoffkonzentration)
PLIER	<i>Logarithmic Intensity Error estimation</i>
PM	<i>perfect match</i>
PMM	Probenmastermix
PP	Probenpaar
prä-mRNS	<i>heteronucleic RNA</i>
PS	Probenset
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWMs	positional weight matrices
qRT-PCR	real-time quantitative PCR / quantitative Echtzeit PCR
R	Radius
rev/R	reverse
rhHGF	recombinant human Hepatocyte Growth Factor
RIN	<i>RNA integrity Number</i>
RNasin	<i>Ribonuclease Inhibitors</i>

## Abkürzungsverzeichnis

RNS	Ribonukleinsäure
RTase	<i>RNA-dependent DNA polymerase</i>
rpm	(engl.) Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunden
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
snRNAs	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
ss	(engl.) Einzelstrang
SSPE	Saline-Sodium Phosphate-EDTA
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
tRNS	Transfer-RNS
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
US	(engl.) Vereinigte Staaten
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
$\alpha$ 1AT	Alpha 1 Antitrypsin

**Gen-Nomenklatur:** In dieser Arbeit wurden die Funktionen vieler Gene und die hierdurch kodierten Proteine dargestellt. Soweit nicht anders Aufgeführt, werden für die entsprechenden Symbole die dafür international festgelegten Abkürzungen und Schreibweisen verwendet. Das bedeutet, dass die Abkürzungen humaner Gene *kursiv* in *GROSSBUCHSTABEN*, die Proteine ebenfalls in *GROSSBUCHSTABEN* aber nicht *kursiv* geschrieben werden. Gene der Maus beginnen mit einem *Großbuchstaben* und werden ebenfalls *kursiv* geschrieben. Die Proteine der Maus beginnen ebenfalls mit einem *Großbuchstaben*, werden aber nicht *kursiv* geschrieben. Bei der allgemeinen Besprechung von Genen oder Proteinen ohne direkten Bezug zu einer bestimmten Spezies wurde die jeweils meist gebräuchliche Schreibweise verwendet.

Also:

KURSIV GROSS (z.B. *BOLA2*) humanes Gen/DNA/RNA

NORMAL GROSS (z.B. BOLA2) humanes Protein

Kursiv Klein (z.B. *BolA2*) murines Gen/DNA/RNA

Normal Klein (z.B. BolA2) murines Protein

## Abbildungsverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.2: Einteilung des Leberläppchens

Abb. 2.2: Schema der morphologischen Hepatokarzinogenese

Abb. 2.3.3: Capping: Anhängen von 7-Methylguanylat (m7G) als Cap-Gruppe am 5'-Ende eines naszierenden RNA-Transkripts

Abb. 2.3.4: Modell für die Spaltung und Polyadenylierung von Prä-mRNA in Säugetierzellen

Abb. 2.3.5.1.A: Modell für den zyklischen Verlauf beim Spleißen durch ein Spleißosom

Abb. 2.3.5.1.B: Verschiedene Modelle für das alternative Spleißen

Abb. 2.4.2 A: Struktur und Proteininteraktion der Myc-Genfamilie

Abb. 2.4.2 B: Zeigt die veränderte MYC Expression und Myc Funktion

Abb. 3.2.1: Zellzyklusverteilung im FL2-A-Histogramm

Abb. 3.2.6: Schematische Darstellung der Schritte (1-8) der Probenvorbereitung

Abb. 4.1: Aat-myc-Genkonstrukt, das zur Generierung der transgenen Mauslinie benutzt wurde.

Abb. 4.2 A-H: Leberschnitte

Abb. 4.3: Darstellung der verschiedenen Arraytypen von Affymetrix

Abb. 4.3.2 A: „Background“-Qualitätskontrolle mit der „Expression Console“

Abb. 4.3.2 B: Vergleich von „Background“ und „pm mean“

Abb. 4.3.2 C: Qualitätskontrolle: Vergleich der Hybridisierung (Poly-A-Spike-In-Kontrolle)

Abb. 4.3.2 D: Qualitätskontrolle zum Vergleich der pos vs neg AUC

Abb. 4.3.2 E: Diagramm zum Vergleich der relative log Probe Cell Intensity (Probe Intensität vor der Normalisierung)

Abb. 4.3.2 F: „Pearson´s Correlation“-Qualitätskontrolle

Abb. 4.3.2 G: Histogramm zur Qualitätskontrolle der Signalintensitäten

Abb. 4.3.2 H: PCA zur Auftrennung von Kontrolle und Tumor

Abb. 4.3.2 I: PCA zur Auftrennung nach Scan-Datum

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 4.3.3 A: Venn-Diagramme zu allen durchgeführten Microarrays

Abb. 4.3.3 B: HCA und PCA aller Exon Array-Daten

Abb. 4.3.3 C: HCA und PCA der normalisierten Exon Array-Daten

Abb. 4.3.3 D: HCA der einzelnen Exon Array-Gruppen zur nicht-transgenen Kontrolle sowie im Einzelvergleich zueinander

Abb. 4.3.3 E: HCA aller Exon Array-Daten mit alternativem Spleiß-Event

Abb. 4.3.3 F: HCA und PCA des Gesamtdatensatzes aus der Arbeit von Katrin Hoffmann

Abb. 4.3.3 G1 – G3: Visuelle Kontrollen der alternativen Spleiß-Events mit dem Biotique-Programm am Beispiel von Mybbp1a

Abb. 4.3.4 A: UCSC-Analyse-Ausschnitt aller für Btbd1 erhaltenen Sequenzen inklusive Primer

Abb. 4.3.4 B und C: UCSC-Analyse-Ausschnitte aller für Arnt2 erhaltenen Sequenzen inklusive Primer

Abb. 4.3.5 A - C: Gen Ontologie-Diagramm zu den molekularen Funktionen

Abb. 4.3.5 D - F: Gen Ontologie-Diagramm zu den biologischen Prozessen

Abb. 4.3.6 A1: Netzwerk Lipidmetabolismus, molekularer Transport und Biochemie kleiner Moleküle

Abb. 4.3.6 A2: Netzwerk Krebs, Proteinsynthese und zelluläre Bewegung

Abb. 4.3.6 A3: Zellzyklus, Entwicklung und Funktion des Haares und der Haut und Stoffwechselkrankheiten

Abb. 4.3.6 B1: Genexpression, Lipidmetabolismus und molekularer Transport

Abb. 4.3.6 B2: Proteinsynthese und Zellzyklus

Abb. 4.3.6 B3: Zellzyklus und Krebs

Abb. 4.3.6 C1: Entwicklungsstörung, neurologische Krankheiten und Krebs

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.3.6 C2: DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur

Abb. 4.3.6 C3: Lipidmetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle

Abb. 4.3.6 D1: Zellmorphologie, hämatologische Systementwicklung und Funktion und Krebs

Abb. 4.3.6 D2: RNS-posttranskriptionale Modifikation, Aminosäure-Metabolismus und posttranslationale Modifikation

Abb. 4.3.6 D3: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Magen-Darm-Erkrankung

Abb. 4.3.6 E1: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Atemwegserkrankungen

Abb. 4.3.6 E2: Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen und organische Verletzungen und Fehlbildungen

Abb. 4.3.6 E3: Neurologische Erkrankung, Skelett- und Muskelerkrankungen und Krebs.

Abb. 4.3.6 F1: Protein-Synthese, dermatologische Krankheiten und Konditionen und erbliche Störung

Abb. 4.3.6 F2: Genexpression, Verdauungssystementwicklung und Funktion und embryonale Entwicklung

Abb. 4.3.6 F3: Zell-Zell-Signalwege und Interaktionen, Entwicklungsstörung und Erbkrankheit.

Abb. 4.3.6 G1: Zelltod und Überleben, Aminosäure-Metabolismus und posttranslationale Modifikationen

Abb. 4.3.6 G2: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen, Erkrankungen der Nieren und urologische Krankheit

Abb. 4.3.6 G3: Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle und Vitamin- und Mineralstoffwechsel

Abb. 4.3.6 H1: Lipidstoffwechsel und Biochemie kleiner Moleküle

Abb. 4.3.6 H2: Verdauungssystem-Entwicklung und Funktion, Organ-Morphologie und organische Entwicklung

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.3.6 H3: Embryonale Entwicklung, Entwicklung des Nervensystems und Funktion sowie Organentwicklung

Abb. 4.3.6 I1: RNS-posttranskriptionale Modifikation, Herz-Kreislauf-Krankheit und Entwicklungsstörung

Abb. 4.3.6 I2: Protein-Synthese, DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur sowie Genexpression

Abb. 4.3.6 I3: Zellulärer Kompromiss, DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur sowie Aminosäure-Metabolismus

Abb. 4.4.1 A - C: TRANSFAC®-Analyse aller in sechs und zwölf Monate alten transgenen Tieren regulierten Gene mit dem Promotorbereich -3Kb/+100b

Abb. 4.5 A - D: Ergebnisse aller „Electrophoretic Mobility Shift Assays“

Abb. 4.6 A - I: Alle Diagramme zur Validierung der Microarray-Daten (MA) mit qRT-PCR

Abb. 4.7 A - E: Alle Diagramme zur Zellzyklusanalyse

Abb. 4.8 A: Western Blot mit Proteinextraktproben aus HGF-stimulierten HepG2-Zellen sowie Myc-Protein als Positivkontrolle (pc) und Proteinextrakt aus nicht stimulierten HepG2-Zellen (c)

Abb. 4.8 B - D: Western Blots mit Myc und Diagramm zu allen Myc-Western Blots

Abb. 4.8 E 1 - E 27: Alle Diagramme der relativen Expressionswerte aus den Western Blots und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente

Abb. 5.5: Ingenuity Pathway Analyse für sechs Monate alte transgene Tiere

## **Tabellenverzeichnis**

### **Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.2 A: Entwicklungsstufen des HCC; HCC, DN und DF

Tab. 2.2 B: Entwicklungsstufen des HCC; LCA und FNH

Tab. 3.1.1: Chemikalien- und Kit- Liste

Tab. 3.1.3 A: Primäre Antikörperliste

Tab. 3.1.3 B: Primäre Antikörperliste der “Housekeeping” Gene

Tab. 3.1.3 C: Sekundäre Antikörperliste

Tab. 3.1.4.1: Tabelle aller benutzten EMSA-Oligos

Tab. 3.1.4.2 A: Tabelle aller benutzten mus musculus (m) qRT-PCR-Primer

Tab. 3.1.4.2 B: Tabelle aller benutzten homo sapiens (h) qRT-PCR-Primer

Tab. 3.1.4.2 C: Tabelle aller benutzten Housekeeping qRT-PCR-Primer

Tab. 3.1.4.2 D: Tabelle aller benutzten Exon-Primer

Tab. 3.1.4.2 E: Tabelle der PCR-Primer zur Überprüfung der Transgenen Tiere

Tab. 3.1.5: Versuchstiere

Tab. 3.1.6: Liste der Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.1.7: Liste der verwendeten Geräte

Tab. 3.1.8: Liste der verwendeten Software und Onlineprogramme

Tab. 3.1.9: Verwendete Zelllinie

Tab. 4.6 A: Fold Change-Ergebnisse der Validierung der Microarray-Daten mit qRT-PCR

Tab. 4.6 B: Fold Change-Ergebnisse der Microarray-Daten mit qRT-PCR

Tab. 4.6 C: Fold Change-Ergebnisse der qRT-PCR von mit HGF-behandelten HepG2-Zellen

Tab. 4.7: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse als durchschnittliche prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen

## **Zusammenfassung**

### **1. Zusammenfassung**

#### **1.1 Abstract/ Conclusion**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common tumors worldwide. Treatment options of HCC and prognosis depend on many factors, especially on tumor size and staging. Dysplasia or intraepithelial neoplasia's are precancerous lesions with high risk for carcinomas. However, the genetic events forcing dysplastic cells into malignant transformation remain uncertain, just as the gene regulatory networks and the exact pathogenic mechanism of cancer. Recent evidence suggests that differential gene expression and gene splicing may play a significant role. Deregulation of c-MYC has been implicated in the origin of diverse human cancers and may contribute to as much as one seventh of U.S. cancer deaths in 2013. The c-MYC's oncogenic activity also may be of critical importance in carcinogenesis.

This study reports findings with a c-Myc disease mouse model of liver cancer that allowed fingerprinting of genes at different stages of carcinogenesis, i.e. dysplasia and subsequent carcinomas. These findings help to define the role of c-Myc in the regulation of genes predisposing hepatocytes to malignant transformation. This link between c-Myc and cancer, accurate monitoring of c-Myc in cells, tissues, and animals is crucial for many biomedical research and drug development projects. To better understand c-Myc function in tumorigenesis Myc-responsive genes have been searched. The findings were obtained in a transgenic mouse model with liver-specific overexpression of c-Myc. Notably, by laser microdissection of dysplastic and tumor lesions and by whole genome expression analysis eight novel candidate genes were identified to be exclusively associated with dysplasia. In liver cancer seven novel c-Myc-responsive genes were identified, which were confirmed in pre-cancerous and malignantly transformed cells by qRT-PCR. Through the application of genetic algorithms c-Myc recognition sites in gene specific promoters were identified. Then, the DNA binding activity of c-Myc at gene specific promoters was confirmed by EMSA band shift assay, while the transcriptional activity of candidate genes were assayed in hepatic growth factor stimulated human hepatoma HepG2 cells. The eight novel candidate genes (Bola2, Mybbp1a, Nhp2, Rpl10a, Rps7, Rps19, Skp1a, and Tfdp1) with association with dysplasia play defined roles in cell cycle regulation. Cell cycle analysis evidenced a significant increase of cells entering the G1-phase. The seven novel c-Myc-responsive genes (C9, Gas6, Pdgfa, Ramp2, Slc10a1, Tmem97, and Vill1) target specifically cancer networks.

## **Zusammenfassung**

Analyzing gene expression and gene splicing by Affymetrix GeneChip® Mouse Exon 1.0 ST Array in dysplasia and HCC liver samples with PALM MicroLaser systems show overlapping GO categories and pathway mapping between gene expression level and alternative splicing levels. The microarray analysis results have been confirmed by qRT-PCR of key genes. Through the application of genetic algorithms splice specific sequences have been recognized and two genes (Arnt2 and Btbd1) have been identified by qRT-PCR and sequencing to be hypothetically alternatively spliced in different stages of cancer.

In brief, this work reports the identification of novel c-Myc-responsive genes for an improved understanding of the c-Myc-regulated networks and helps to define a role of c-Myc in the regulation of genes predisposing hepatocytes to malignant transformation. The used mouse model is able to visualize the different stages of liver cancer development, which is still not completely understood. It enables further analysis for clarification of tumorigenesis that build the cornerstone for an early diagnostic of HCC and purchase potential therapeutic target interventions. Also the new investigated post-transcriptional modifications realize a start point for future research. The integration of pre-mRNA processing alterations in the molecular portrait of liver cancer development will certainly contribute to the understanding of the disease and the development of new effective therapies. The implementation of new technologies like deep sequencing of transcriptome (RNA-seq) allows known transcript quantification as well as novel transcript discovery, which yield valuable information on all splicing events. These approaches will allow the identification of new splicing defects with potential pathological significance and the generation of splicing signatures that may have prognostic value. Further molecules that can change alternative splicing and antisense strategies could be developed for potential therapeutic targets. All this needs to be further investigated.

Keywords: c-Myc transgenic model; dysplasia; hepatocellular carcinoma (HCC)

### **1.2 Zusammenfassung**

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört weltweit zu den häufigsten Tumorarten. Die Behandlungsmöglichkeiten von HCC und die Heilungsprognosen sind abhängig von vielen Faktoren, vor allem aber von der Tumorgröße und dem Stadium. Dysplasien oder intraepitheliale Neoplasien sind präkanzeröse Läsionen, die ein hohes Risiko für Karzinome

## Zusammenfassung

besitzen. Allerdings sind die genetischen Ereignisse, die entartete Zellen in eine bösartige Transformation zwingen, unbekannt. Auch die genregulatorischen Netzwerke und die genauen Pathomechanismen von Krebs sind noch nicht aufgeklärt. Aktuelle Hinweise deuten darauf hin, dass die differentielle Genexpression und das Gen-Spleißen eine wichtige Rolle spielen. Die Deregulierung von c-MYC wurde mit der Entstehung verschiedener menschlicher Krebserkrankungen in Verbindung gebracht und trug im Jahr 2013 zu einem Siebtel der US-Todesfälle durch Krebs bei. Die onkogene Aktivität von c-MYC ist in der Karzinogenese ebenfalls von entscheidender Bedeutung.

Diese Arbeit berichtet von Erkenntnissen mit einem c-Myc-Leberkrebsmodell der Maus, welches einen genetischen Fingerabdruck von verschiedenen Stadien der Karzinogenese, wie Dysplasien und nachfolgenden Leberkarzinomen, ermöglicht. Es konnte aufgezeigt werden, welche Rolle c-Myc in der Regulation von Genen spielt, die Hepatozyten zur malignen Transformation prädisponieren. Die Verbindung zwischen c-Myc und Krebs bietet ein genaues Beobachtungssystem von c-Myc in Zellen, Geweben und Tieren und ist dadurch entscheidend für die biomedizinische Forschung und für Projekte der Arzneimittelentwicklung. Um die Funktion von c-Myc in der Tumorigenese besser verstehen zu können, wurde nach c-Myc-abhängigen Genen gesucht. Die Ergebnisse wurden mit einem transgenen Mausmodell mit leberspezifischer Überexpression von c-Myc erzielt. Es konnten in Laser-Mikrodissektionen von dysplastischen und Tumorläsionen Expressionsanalysen im gesamten Genom durchgeführt werden. So wurden acht neue c-Myc-abhängige Gene identifiziert, die ausschließlich mit Dysplasie assoziiert werden konnten, sowie sieben neue c-Myc-abhängige Gene, die mit Tumoren assoziiert werden konnten. In präkanzerösen und maligne transformierten Zellen wurden diese Gene mit qRT-PCR bestätigt.

Es wurde ferner ein Algorithmus angewendet, der genetische c-Myc-Bindestellen in Gen-spezifischen Promotoren identifiziert. Die DNA-Bindungsaktivität von c-Myc an spezifische Promotoren der Gene wurde durch EMSA bestätigt, während die Transkriptionsaktivität der Kandidaten in humanen Hepatomzellen (HepG2-Zellen), die mit einem Leberwachstumsfaktor stimuliert wurden, untersucht wurde. Die acht neuen Kandidaten (Bola2, Mybbp1a, Nhp2, Rpl10a, Rps7, Rps19, Skp1a und Tfdp1), die mit Dysplasie in Verbindung gebracht wurden, spielen eine Rolle in der Zellzyklusregulation. Eine Zellzyklusanalyse zeigte eine signifikante Zunahme der mit HGF behandelten HepG2-Zellen in der G1-Phase. Die sieben

## Zusammenfassung

neuen c-Myc-abhängigen Gene (C9, Gas6, Pdgfa, Ramp2, Slc10a1, Tmem97 und Vill) wurden speziell in Krebsnetzwerken gefunden. Die Analyse der Genexpression und des Spleißens mit dem Affymetrix Genechip® Maus Exon 1.0 ST Array, die in Dysplasie- und HCC-Leberproben mit dem PALM Microlaser-System gewonnen wurden, zeigen überlappende GO-Kategorien und vergleichbare Zuordnungen der Signalwege zwischen signifikanter Genexpression und alternativen Spleißereignissen. Die qRT-PCR von Schlüsselgenen bestätigt die Analyseergebnisse des Microarrays. Durch die Anwendung von Algorithmen, die spleißspezifische Sequenzen im Genom erkennen, wurden zwei Gene (Arnt2 und Btbd1) identifiziert, die in verschiedenen Stadien von Krebs möglicherweise alternativ gespleißt wurden. Auch dieses Ergebnis haben die qRT-PCR und die Sequenzierung verifiziert.

Zusammengenommen konnten im Rahmen dieser Arbeit neue c-Myc-abhängige Gene identifiziert werden, die für ein besseres Verständnis der von c-Myc regulierten Netzwerke sorgen. Neben diesem konnte die Rolle von c-Myc in der Regulation der Gene, die die Hepatozyten zur malignen Transformation führen, besser definiert werden. Das verwendete Mausmodell ist in der Lage, die verschiedenen Stadien der Leberkrebsentwicklung zu analysieren, welche bislang noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Das Gesamtergebnis ermöglicht weitere Analysen zur Klärung der Tumorentstehung, die den Grundstein für eine Früherkennung von HCC und einen potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt bietet. Auch die neuerkannten posttranskriptionellen Modifikationen ermöglichen einen Startpunkt für weiterführende Forschungen. Die Verbindung der veränderten prä-mRNA-Verarbeitung in einem molekularen Kontext der Leberkrebsentwicklung wird sicherlich zu einem besseren Verständnis der Krankheit und zur Entwicklung neuer wirksamer Therapien führen. Die Einführung neuer Technologien, wie das „deep sequencing of transcriptome“ (RNA-seq), ermöglicht die Quantifizierung von bereits bekannten Transkripten sowie die Identifizierung neuartiger Transkripte und liefert wertvolle Informationen über alle Spleißereignisse. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Identifikation neuer Spleiß-Defekte mit potentielltem Krankheitsbild sowie die Identifikation von Spleiß-Signaturen, die von prognostischem Wert sein können. Ferner können Moleküle, die das alternative Spleißen verändern, und Antisense-Strategien als potentielle therapeutische Ziele eingesetzt werden. All dies muss allerdings noch weiter untersucht werden.

## Zusammenfassung

Eine Aufklärung der molekularen Veränderungen, die mit der malignen Transformation einhergehen, kann sowohl als Grundstein einer Früherkennung von Leberkrebs als auch als Ansatzpunkt einer Therapie dienen. Die Analyse des *c-Myc*-überexprimierenden Mausmodells kann als vielversprechend gelten, da Mensch und Maus 99 % der Gene gemeinsam haben und so in der Maus die vielfältigen Funktionen des *c-Myc*-Gens und die sich durch dieses Proto-Onkogen verändernden Prozesse darstellen lassen. Ebenso ist es möglich, die fortschreitende Entwicklung zum HCC auf molekularer Ebene zu analysieren. In einem Aat-Myc-transgenen Mausmodell wurden mittels 3' IVT und Exon Array Genexpressionsdaten verschiedener Alters- und Entwicklungsstadien ermittelt. Es zeigte sich, dass das Aat-Myc-transgene Mausmodell ein ideales Modell für die sequenzielle Leberkrebsentstehung ist.

Schlagerworte: *c-Myc* transgenes Modell; Dysplasie; hepatozelluläre Karzinom (HCC)

## **Einleitung**

### **2. Einleitung**

Diese Arbeit befasst sich mit der Identifikation von Genen mit dem Potential zur Transformation von präkanzerösen Läsionen (Dysplasie) zu malignen Lebertumoren (Hepatozelluläres Karzinom, HCC) in einem transgenen Mausmodell. Einleitend möchte ich zunächst auf den Aufbau der Leber und deren Funktion eingehen. Im Späteren werde ich den Leberkrebs und dessen Risikofaktoren erläutern. Im Anschluss gehe ich auf die Klassifikationen des hepatozellulären Karzinoms sowie dessen Vorläuferläsionen ein. Um zu verstehen, wie die Gene das Potential zur Transformation besitzen, gehe ich im Weiteren auf die Regulation der Genexpression, mit Transkription, Processing, Capping, Polyadenylierung und Spleißen, ein. Da diese Arbeit auch Gene mit Spleiß Varianten untersucht, werden hierzu noch die Regulation des Spleißmechanismus erläutert sowie das alternative Spleißen im HCC. Da es sich um ein *Aat-Myc* transgenes Mausmodell handelt in dem die sequentielle maligne Transformation untersucht wurde, beschäftigt sich der anschließende Teil der Einleitung mit dem Protoonkogen *Myc*. Hierzu erläutere ich die Struktur und Funktion des Gens und des Proteins, dessen Regulation sowie dessen Bedeutung in der Karzinogenese. Abschließend gehe ich auf die Zielsetzung in dieser Arbeit ein.

### **2.1 Die Leber**

#### **2.1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion**

Die Leber ist mit einem Gewicht von etwa 1,5 kg das größte Einzelorgan im menschlichen Körper. Sie liegt im rechten Oberbauch und ist durch das Zwerchfell von der Lunge getrennt. Ihre Funktion ist die Speicherung, Umwandlung, Entgiftung, Inaktivierung und Ausscheidung körpereigener und körperfremder Substanzen, wobei sie eng in die Steuerung des Glukose-, Fett- und Eiweißstoffwechsels eingebunden ist. Die Leber beeinflusst, gesteuert durch Hormone wie Insulin und Glukagon, den Blutzuckerspiegel und kann ihn, unabhängig von der Nahrungsmittelzufuhr, konstant halten. Hierbei bewirkt Insulin in der Leber die Umwandlung des Zuckers in die Speicherform Glykogen und hemmt den Abbau von Fett. Das Hormon Glukagon regt seinerseits die Leber zum Glykogenabbau an und agiert somit als Gegenspieler zum Insulin. Weitere Syntheseleistungen erbringt die Leber bei der Glukoneogenese, der Neubildung von Traubenzucker aus z. B. Glycerin, Lactat/Pyruvat und manchen Aminosäuren, der Ketonkörpersynthese, der Synthese von Cholesterin und den hieraus abgeleiteten Gallensäuren, der Synthese von Bluteiweißen wie Albumin, Globulinen, Gerinnungsfaktoren und Akute-Phase-Proteinen (z. B. Fibrinogen, Alpha1-Antitrypsin,

## Einleitung

Serum-Amyloid-A (SAA), Alpha1-Glykoprotein, Haptoglobin, Komplement-C3, Plasminogen und Ferritin). Des Weiteren hat die Leber die Funktion der Speicherung von Glucose (als Glykogen), Fett (als Lipoprotein), einigen Vitaminen und Blut. Auch hilft die Leber beim Abbau und bei der Entgiftung von geschädigten und alten Erythrozyten, von Steroidhormonen sowie Medikamenten. Außerdem baut sie Hämoglobin zu Bilirubin und Harnstoff zu Ammoniak um. Während der Fetalzeit übernimmt sie die Blutbildung. Sie dient als exokrine Drüse durch die Produktion von Galle zum Fettabbau im Darm. Die Leber hat eine ausgeprägte Fähigkeit zur Regeneration, wenn ein Teil abstirbt oder verletzt wird. Voraussetzung hierfür ist, dass die Ursache der Verletzung beseitigt ist und weniger als fünfzig Prozent der funktionellen Masse des Organs geschädigt wurden sowie die Regenerationsfähigkeit bei der Verletzung erhalten blieb. Die Leber besitzt diese Fähigkeit, da Hepatozyten intermitotische Zellen sind, die bei Zellverlust sehr schnell in Teilung kommen und regenerieren. Damit ein verletztes Leberläppchen regeneriert, müssen die Sinusoide (kleine Blutgefäße) als Leitschiene erhalten bleiben, ansonsten entstehen ungeordnete Pseudolobuli (Regenerationsknoten). Sollte eine Regeneration durch die Hepatozyten nicht mehr gelingen, übernehmen die Gallenkanälchen den Regenerationsversuch. Diese Eigenschaft der Hepatozyten bietet bei Lebertransplantationen einen großen Vorteil, da Vernarbungen wie beispielsweise bei Hautverletzungen in der Leber nicht auftreten. Die Regenerationsfähigkeit der Leber sollte aber nicht zu der Annahme verleiten, dass dieses zentral lebenswichtige Organ permanent belastet werden kann. Nach überstandener Krankheit muss die Leber bis zur vollständigen Genesung geschont werden. So ist die Überlieferung aus der Sage des Prometheus in der griechischen Mythologie, die Regenerationsfähigkeit der Leber sei scheinbar unendlich, ein Trugschluss. Prometheus wurde zur Strafe für die Übergabe des Feuers an die Menschen an einen Felsen geschmiedet, ein Adler hackte täglich einen Teil seiner Leber heraus, der aber bis zum nächsten Tag nachwuchs [Hes.theog.521-523; Apoll.Rhod.2,1247].

### 2.1.2 Aufbau der Leber im Detail

Die Leber ist in zwei große Leberlappen (rechter/ *Lobus dexter* und linker/ *Lobus sinister*) und zwei kleinere Leberlappen (quadratischer/ *Lobus quadratus* und geschwänzter/ *Lobus caudatus*) unterteilt. Diese sind nochmals in Leberläppchen von 1–2 mm Größe unterteilt, die sich im Anschnitt als sechseckige Gebilde zeigen. Hier findet eine Gliederung in Zentralvenenläppchen oder Portalvenenläppchen, Leberazinus, Leberzuflüsse, Sinusoide,

## Einleitung

Kupffersche Sternzellen (Leber-Makrophagen), Ito-Zellen (Fettspeicherzellen der Leber), Hepatozyten und Gallenkapillaren statt.

Die Leber besteht aus ca. 1-1,5 Mio. Zentralvenenläppchen, welche eine zentral gelegene Vene und einen radial davon ausgehenden Blutsinus und Leberzellbalken aus Hepatozyten enthalten. In den Ecken der Zentralvenenläppchen liegen in den periportalen Feldern die Glisson'schen Trias, die aus Endästen der Pfortader (*Vena portae*), der Leberarterie (*Arteria hepatica propria*) und einem interlobulären Gallengang bestehen; man bezeichnet den Ast der Pfortader als *Vena interlobularis*, den Ast der Leberarterie als *Arteria interlobularis* und den Gallengang als *Ductus biliferus*. Das Bindegewebe ist in der Leber auf die Portalkanäle beschränkt und bildet hier die periportalen Felder; retikuläre Fasern begleiten die Blutsinus und bilden dadurch ein dünnes bindegewebartiges Netz. Zwischen den Leberzellen liegen die erweiterten Kapillaren der Leber (Lebersinusoiden). Ihr Lumen ist 9-12 µm weit ihr Endothel besitzt Poren, die als Siebplatten bezeichnet werden. Zwischen dem Endothel und den Hepatozyten liegt der ca. 0,3 µm breite Disse'sche Raum, in den Mikrovilli der Hepatozyten hineinragen. Der Disse'sche Raum besitzt keine Basallamina, sondern ein Stützgerüst aus Kollagenfibrillen. Die Endothelzellen besitzen Endozytoserezeptoren für denaturierte Plasmaproteine und acetyliertes LDL („Low Density Lipoprotein“). Außerdem beeinflussen die Endothelzellen die Durchblutung der Sinusoide. Diese Sinusoide enthalten spezielle Makrophagen, die Kupfferschen Sternzellen, die zum Mononukleären Phagozytären System (MPS) gehören. Ihre Fortsätze reichen in den Disse'schen Raum und in die Sinusoide hinein. Sie sind unter anderem verantwortlich für die Eliminierung von alten Erythrozyten. Die Hepatozyten sind die eigentlichen Leberparenchymzellen, deren perisinusoidale Oberfläche mit Mikrovilli besetzt ist. Ihre apikalen Membranen begrenzen das Lumen der Gallenkapillaren; dort existiert auch ein Schlussleistenkomplex zwischen den Leberzellen. Die Hepatozyten haben meist mehrere Zellkerne und können auch polyploid sein, d. h. sie können mehrere Chromosomensätze enthalten. Die Hepatozyten verfügen über viele Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und Glykogenpartikel. Ein weiterer Zelltyp, der sich im perisinusoidalen Raum befindet sind die Ito-Zellen (hepatische Sternzellen), wobei es sich um Fettspeicherzellen handelt, die viel Vitamin A enthalten und Kollagen bilden können. Sie sind deshalb verantwortlich für die Vernarbung der Leber bei einer Leberzirrhose. Die Sinusoide transportieren das Blut der Pfortader zusammen mit dem Blut aus der Leberarterie durch die Leberläppchen in Richtung der Läppchenzentren, wo es jeweils

## Einleitung

von einer Zentralvene (*Vena centralis*) aufgenommen wird. Die Zentralvenen vereinigen sich zu größeren Venen (*Venae sublobulares*) und schließlich zur Lebervene (*Vena hepatica*).

Bei der Einteilung der Leber in Portalvenenläppchen werden diejenigen Sinus und Leberzellbalken zusammengefasst, die von einem Portalkanal versorgt werden. Die abführenden Venen liegen an den Ecken des Läppchens. Hierbei handelt es sich um eine funktionelle Einteilung. Die mittlere Achse eines Azinus stellt ein Bündel mit den terminalen Zweigen der Versorgung, den Gefäßen des Glisson-Trias dar. Diese Einteilung berücksichtigt, dass ein Versorgungsbündel das Blut in beide benachbarten Läppchen entlassen kann. Die am nächsten am Versorgungsbündel liegenden Hepatozyten werden am besten mit Sauerstoff und Nährstoffen beliefert, weshalb sie als Zone 1 des Azinus bezeichnet werden. Weiter zum Zentrum des klassischen Läppchens liegen dann die Zonen 2 und 3.

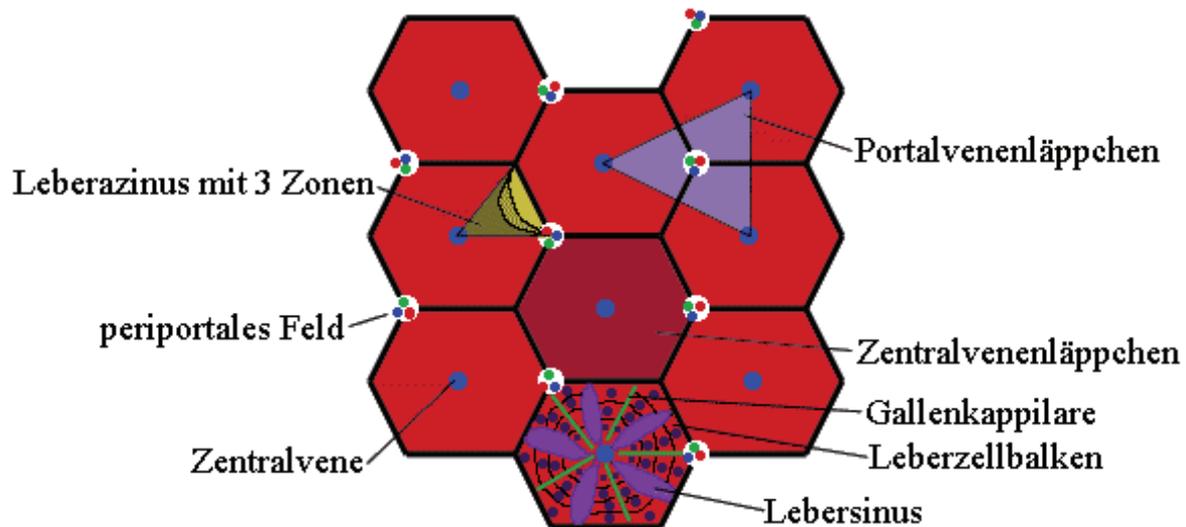


Abb.2.1.2: Aus: Histologieskript, Tobias Schwarz, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Würzburg

### 2.1.3 Leberkrebs

#### (Zahlen und Fakten aus Globocan 2012 (IARC) World Health Organisation)

Leberkrebs ist ein großes Problem in den weniger entwickelten Regionen der Welt, in denen 83 % der 782.000 neu ermittelten Krebserkrankungen in 2012 festgestellt wurden, 50 % davon allein in China. Es ist der fünfthäufigste Krebs bei Männern (554.000 Fälle, 7,5 % insgesamt) und der neunthäufigste bei Frauen (228.000 Fälle, 3,4 % insgesamt). Nordeuropa gehört mit einer Inzidenz von 4,6 bei Männern und 1,9 bei Frauen zu einer Region mit einer niedrigen Rate.

## Einleitung

8,2 Millionen Menschen sterben jedes Jahr an Krebs, das sind 13 % aller Todesfälle weltweit. Darunter ist Leberkrebs mit einer ermittelten Rate von 746.000 Todesfällen in 2012 (9,1 % aller Todesfälle) die zweithäufigste Ursache für Todesfälle durch Krebserkrankungen. Die Prognose für Leberkrebs ist sehr schlecht mit einer Rate von 0,95 (Todesfälle/Erkrankung). Die Krebsinzidenzrate im gesamten Altersdurchschnitt liegt bei Männern (Rate 205 pro 100.000) um fast 25 % höher als bei Frauen (Rate 165 pro 100.000), wobei die Inzidenzrate bei Männern in den verschiedenen Regionen zwischen 79 pro 100.000 und bis zu 365 pro 100.000 um fast den Faktor fünf variiert. Bei den Inzidenzraten der Frauen gibt es weniger Schwankungen mit Raten von 103 pro 100.000 und 295 pro 100.000.

### 2.1.4 Risikofaktoren für Leberkrebs

Die größten Risikofaktoren für Leberkrebs sind Leberzirrhosen, Hepatitis-Infektionen, Aflatoxine, nichtalkoholische Fettleberhepatitis (NASH), die Einnahme von Androgenen (Sexualhormon), Stoffwechselstörungen und Erkrankungen wie Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Hämochromatose, Autoimmunhepatitis, Adipositas, Morbus Wilson und Tyrosinämie sowie die Exposition mit Tetrachlorkohlenwasserstoff, Alkoholismus und Tabakkonsum.

90 % aller HCC-Erkrankungen entstehen im Rahmen einer Leberzirrhose [Levrero, 2006], die somit den größten Risikofaktor darstellt. Jede Leberzirrhose ist daher als Präkanzerose anzusehen, gefolgt von chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektionen mit etwa 50 % aller Fälle [Farazi und DePinho, 2006, Alter, 2007]. Bei einer Hepatitis-C-Virus-Infektion steigt das Risiko für hepatozelluläre Karzinome (HCC) um das Fünf- bis 20-fache [Alter, 2007]. Bei einer Hepatitis-Infektion integriert das Virus in die DNA des Wirtes, was zu genetischen Veränderungen führt. Es konnte gezeigt werden, dass das HBV-Protein x (HBx) die Gene *IGF2* und *IGFR1* im Wirt aktiviert, während es Tumorsuppressor-Proteine wie p53, PTEN und RB blockiert [Sun et al., 2007]. Des Weiteren interagiert es mit mitochondrialen Signalwegen wie PI3K/AKT und RAF/MEK/ERK [Kang-Park et al., 2006; Sun et al., 2007; Zhu et al., 2007; Matsuda und Ichida, 2009 / Mukherji et al., 2009]. Diese beiden Signalwege regulieren das Überleben, die Apoptose, die Proliferation und den Stoffwechsel der Eukaryoten. Die Deregulation dieser Signalwege konnte in Verbindung gebracht werden mit einer Reihe von Krebserkrankungen [McCubrey, 2006]. Das Mykotoxin AFB1, welches der Pilz *Aspergillus* produziert, wird nach Aufnahme in die Hepatozyten mithilfe von Zytochrom P450 oxidativ zu einem sehr reaktionsfähigen Epoxid umgewandelt. Die karzinogene

## Einleitung

Wirkung wird durch die Immigration des Epoxids in den Nucleus hervorgerufen, wo es mit der DNA Addukte bildet und so Mutationen verursachen kann. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass Aflatoxin Protoonkogene aktiviert und Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* auslöst [Harris C.C. et al., 1991 und Bergasa N.V. et al., 1996]. Ein hoher Alkoholkonsum zählt ebenfalls zu den Risikofaktoren und besitzt zudem auch einen synergistischen Effekt bei gleichzeitiger Hepatitis-Infektion. Die karzinogene Wirkung des Alkohols beruht auf dessen Abbauprodukt, dem Azetaldehyd, welches sehr reaktiv ist und eine kovalente Bindung mit verschiedenen Makromolekülen und der DNA eingeht [Mufti et al., 1993]. Dadurch besitzt es eine direkte mutagene und karzinogene Wirkung. Das Ethanol selbst ist folglich als Prokarzinogen einzustufen. Des Weiteren interferiert Azetaldehyd direkt mit der DNA-Reparaturmaschinerie [Espina et al., 1988]. Einen weiteren synergistischen Effekt hat das Rauchen von Tabak, welches mit Alkoholismus und einer Hepatitis-Infektion das Risiko eines HCC steigert [Yu et al., 1983]. Adipositas, Diabetes mellitus und die Einnahme von Sexualhormonen gelten ebenfalls als Risikofaktoren [Mazzanti R. et al., 2016]. Auch wenn die meisten Medikamente keinen direkten Einfluss auf die Karzinogenese besitzen, werden diese doch vielfach von der Leber abgebaut und ausgeschieden, was bei Vorliegen einer Lebererkrankung vermieden werden sollte um die Leber nicht weiter zu belasten. Neben all den Risikofaktoren konnte eine Meta-Analyse zeigen, dass jeglicher Kaffee-Konsum das HCC Risiko um 40% reduzieren kann. Dies liegt zum einen daran, dass Patienten mit Lebererkrankungen ihren Kaffeekonsum reduzieren, zum anderen konnte gezeigt werden, dass der Kaffee auf Leberenzyme einwirkt und dadurch die Entwicklung von Zirrhosen beeinflusst [La Vecchia C. et al., 2013 und Dranoff J.A. et al., 2015].

## 2.2 Klassifikation der Dysplasie und des HCC

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) entwickeln sich wie die übrigen Organumoren in einem mehrstufigen Prozess, wobei die molekulare Pathogenese des HCC bisher nicht geklärt ist. Es ist davon auszugehen, dass während dieser mehrstufigen Entwicklung morphologische Vorstufen auftreten, die mit unterschiedlicher Häufigkeit und Wahrscheinlichkeit in ein HCC übergehen. So können regenerative Läsionen wie multiazinäre Regeneratknoten, Lobuläre segmentale Hyperplasie und Fokale noduläre Hyperplasien (FNH) auftreten [Drebber und Dienes, 2006]. Weitere morphologisch fassbare prä-maligne Vorläuferläsionen sind in dysplastische oder neoplastische Läsionen unterteilt, zu denen das hepatozelluläre Adenom, dysplastische Foci (DF), dysplastischer Knoten (DN) und das hepatozelluläre Karzinom

## Einleitung

(HCC) gehören. Die dysplastischen Knoten können hierbei wiederum in dysplastische Knoten mit geringer Atypie („low grade“) und dysplastische Knoten mit schwerer Atypie („high grade“) unterteilt werden [Drebber und Dienes, 2006]. In der Tumorpathologie bezeichnet man die sichtbare Missbildung oder Fehlbildung eines Gewebes als Dysplasie. Die Dysplasie ist hierbei als eine atypische Zellproliferation in einem Gewebe zu verstehen, welche noch nicht zu einer Tumorbildung geführt hat, sie stellt aber die Vorstufe eines malignen Tumors - also eine Präkanzerose Läsion - dar. Das Stadium der Dysplasie ist im Gegensatz zum Tumor noch reversibel, wenn die Ursachen, die zur atypischen Zellproliferation geführt haben beseitigt werden.

Tabelle 2.2 A: Entwicklungsstufen des HCC; HCC, DN und DF

	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	Dysplastischer Knoten (DN)		Dysplastische Foci (DF)
		high grade	low grade	
Geschlecht	m>f			
Ätiologie	HBV + HCV; Zirrhosen, Hämochromatose			
Größe (homo sapiens)	<0,5 cm	0,1-1,5 cm	>0,1 cm	<0,1 cm
Prognose/ Komplikationen	je nach Tumorbefund und Resektionsfähigkeit (frühes HCC (ohne Kapsel= gute Prognose, AFP negativ); hochdifferenziertes HCC (eingekapselt= schlechte Prognose; AFP positiv)); Metastasierung, Portalvenenthrombose, Progression	Präneoplasie; gut bei Exzision (Resektion?) im Gesunden; maligne Transformation	gut, aber es zeigt eine erhöhte maligne Transformationsbereitschaft der Zellen	
Histologie/ Zytologie	trabekuläre Architekturstörung (pseudo granuläre Muster, ≤3 Zelllagen Trabekel, Retikulinfaserverlust, erhöhte Zytoplasmatische Basophilie, Hyperzellularität (erhöhtes Kern-Zytoplasma Verhältnis), interstitielle Invasion	geringe trabekuläre Architekturstörung, klonales Wachstum, diskrete Hyperzellularität (leicht erhöhtes Kern-Zytoplasma Verhältnis), Zytoplasma mit basophiler und sinusoidale Derivation der Kerne, nicht randbildend	diskrete Hyperzellularität, geringe Strukturveränderungen, oft eosines Zytoplasma	früheste Läsion, kleinzellige, klonal erscheinende Proliferate, gering verändertes Kern-Zytoplasma Verhältnis, Kompression der umgebenen Parenchymzelllage

## Einleitung

	(Gefäßeinbrüche= Malignitätskriterium)			
Therapie	Resektion, Lebertransplantation, lokale Verfahren	Resektion		Überwachung durch Ultraschall
Immunohistologische Marker	Glypican3, Glutaminsynthetase, Heat Shock Protein 70, β-Catenin			

Tabelle 2.2 B: Entwicklungsstufen des HCC; LCA und FNH

	Hepatozelluläres Adenom (LCA)	Fokale noduläre Hyperplasie (FNH)
Geschlecht	m<f	
Ätiologie	Gonadale und anabole Steroide, Kontrazeptiva, Kohlenhydratstoffwechselkrankheiten	orale Kontrazeptiva fördern das Wachstum (nicht die Entstehung)
Größe (homo sapiens)	1-10 cm	1-5 cm
Prognose/ Komplikationen	gut, aber Blutungsrisiko bei Resektion, selten maligne Transformation	gut
Histologie/Zytologie	morphologische, klonale, nicht umkapselte Hepatozelluläre Proliferation, keine Atypien, Fehlen regulärer Portalfelder, oft Glykogen und/oder Fetteinlagerung, Zellen sind größer als umgebene Hepatozyten	zentrale Narbe mit radiären Septen, zentrale atypische Gefäßstrukturen mit exzentrischer Mediahyperplasie, duktiläre Proliferate, fokale lymphozytäre Aggregate, Zellen kleiner als umgebene Hepatozyten, normales Kern-Zytoplasma Verhältnis
Therapie	Steroidentzug, Resektion	Steroidentzug

## Einleitung

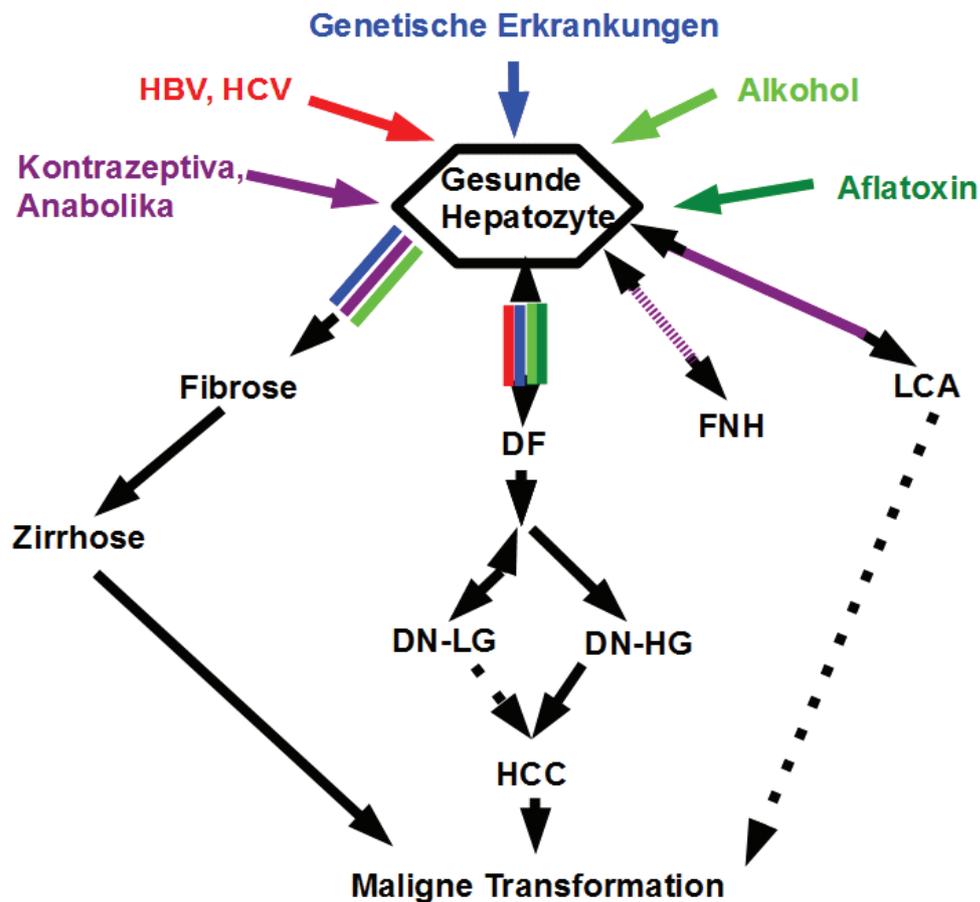


Abb.2.2: Schema der morphologischen Hepatokarzinogenese

### 2.3 Regulation der Genexpression in Eukaryoten

Neben der konstitutiven Expression der sogenannten Housekeeping-Gene, die dem Erhalt der allgemeinen Zellfunktionen dienen, unterliegen der Hauptteil der Gene einer differenziellen Expression. Diese Expression ist zumeist zelltyp-, entwicklungs- oder signalabhängig und nimmt dadurch eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung, -differenzierung und -alterung ein. Die genaue Abfolge der Genexpression, die durch gezieltes An- und Abschalten der Gene erreicht wird, ermöglicht es der Zelle, auf Einflüsse von außen zu reagieren und in eine Vielzahl von Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen zu differenzieren. Die Genexpression stellt einen komplexen, hoch stringent kontrollierten Vorgang dar, der bei Fehlregulation zu verschiedenen Krankheiten und auch zu Krebs führen kann. Die Genexpression erfolgt in mehreren Stufen, die eine Regulation ermöglichen. Sie unterteilt sich in die Initiation der Transkription, die Elongation und Termination der Transkription, das Processing (Capping, Polyadenylierung, Spleißen), den Transport ins Zytoplasma, die Initiation der Translation und posttranslationale Modifikationen.

## Einleitung

### 2.3.1 Transkription

Die Transkription ist die Übersetzung der DNA-Information in mRNA und wird durch regulatorische Proteine kontrolliert. Eine Regulation kann bereits durch die Struktur der DNA selbst variiert werden, indem z. B. bestimmte DNA-Bereiche vielfach kopiert (Amplifikation) oder umgeordnet („Rearrangement“) werden. So kann durch Methylierungen oder andere Modifikationen die Chromatin-Struktur der DNA mehr oder weniger zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie gemacht werden (Epigenetische Regulation). Erst die Initiation durch regulatorische Proteine (Transkriptionsfaktoren), die an spezifischen DNA-Elementen der Promotoren binden (Transkriptionsfaktor-Bindestellen), induziert die Transkription. UPEs („upstream promoter elements“) sind essentielle Elemente, die die effiziente Transkription, und somit die Aktivität des Promotors durch weitere Bindungssequenzen, steigern. Neben diesen konstitutiven Promotorbereichen gibt es die *cis*-regulatorischen Elemente, an deren spezifischen Erkennungssequenzen DNA-bindende Proteine andocken.

Diese *cis*-regulatorischen Elemente können signalabhängig (z. B. durch Hormone oder Wachstumsfaktoren) die Aktivität des Promotors gewebe-, entwicklungs- oder zelltypspezifisch verstärken (Enhancer) oder hemmen (Silencer). Diese *cis*-regulatorischen Elemente sind folglich wichtig für die konstitutive sowie die differenzielle Genexpression. Es können somit zwei Arten von Transkriptionsfaktoren unterschieden werden: die basalen Transkriptionsfaktoren, die ubiquitär in jedem Zelltyp exprimiert werden [Buratowski, 1994], und die zell- und gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription zell- und gewebespezifischer Gene durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen regulieren. Diese gewährleisten eine zelltypspezifische Ausstattung an ubiquitären und zellspezifischen Proteinen, sodass die Zelle ihre spezifischen Funktionen ausführen kann. Hierbei werden beispielsweise in den Hepatozyten verschiedene Transkriptionsfaktoren (z. B. HNF1 $\alpha$ + $\beta$ , HNF3 $\alpha$ , $\beta$ + $\gamma$ , HNF4 $\alpha$ , CEBP $\alpha$ , $\beta$ + $\delta$ , GATA4+6) reguliert, die kooperativ die Expression leberspezifischer Gene regulieren [Lehner et al., 2010].

### 2.3.2 Processing

Eukaryoten verfügen neben der Regulation durch Transkriptionsfaktoren noch über einen Regulationsmechanismus, der als Processing bezeichnet wird und ebenfalls die Expression reguliert. Dieses Processing findet zwischen der Transkription und der Translation statt. Zum posttranskriptionellen Processing zählen das Capping, die Polyadenylierung und das Spleißen. Diese Vorgänge verändern die Eigenschaften der prä-mRNA.

## Einleitung

### 2.3.3 Capping

Beim sogenannten Capping wird an das 5'-Ende der prä-mRNA eine 7-Methylguanylat-Gruppe ( $m^7G$ ) angehängt. Dieser Prozess startet bereits während der Transkription, man kann daher das Capping auch als cotranskriptionelles Processing betrachten. Die beiden ersten Schritte, die zum Anhängen der 7-Methylguanylat-Gruppe ( $m^7G$ ) führen, werden durch das dimere Capping-Enzym katalysiert. Das Enzym bindet dabei an die phosphorylierte carboxyterminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II und hydrolysiert die terminale  $\gamma$ -Phosphatgruppe der Triphosphatase, wobei ein GMP Rest mittels 5'-5'-Triphosphat-Bindung auf das 5'-Ende der prä-mRNA übertragen wird (in Abb.2.3.3: Schritt 1 und 2). Im Anschluss wird die Position 7 des Guanins, durch mRNA-cap-Methyltransferase unter Verbrauch von S-Adenosylmethionin zu 5'-5'  $m^7GpppN$ , methyliert (in Abb.2.3.3: Schritt 3 und 4). Neben der Methylierung der ersten Base der mRNA kann auch noch die zweite Base methyliert werden. Diese beiden möglichen Cap-Strukturen sind für die Bildung des Initiationskomplexes der Translation notwendig. Sie schützen ferner vor dem Abbau durch Exonucleasen, führen zu einem effizienteren Transport aus dem Zellkern und zu einer erhöhten Translationsrate (ca. 300-fach).

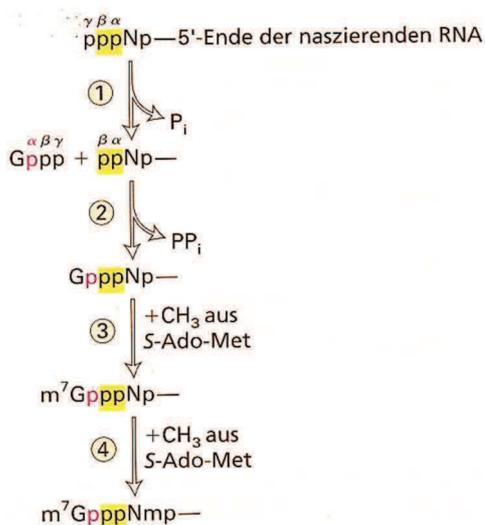


Abb. 2.3.3: Capping: Anhängen von 7-Methylguanylat ( $m^7G$ ) als Cap-Gruppe am 5'-Ende eines naszierenden RNA-Transkripts [Lodish et al.,2001]

### 2.3.4 Polyadenylierung

Bei der Polyadenylierung werden zwischen 200 und 250 Adenin-Nucleotide an das 3'-Ende der prä-mRNA angefügt (Poly-A-Schwanz). Bei diesem Prozess bindet der Spaltungs-

## Einleitung

/Polyadenylierungs-Spezifitätsfaktor (CPSF, *cleavage and polyadenylation specificity factor*) an eine stromaufwärts liegende Polyadenylierungs-Signalsequenz (5'...AAUAAA...3'). Diese CPSF tritt mit dem Spaltungsstimulationsfaktor (CStF, *cleavage stimulatory factor*), der an einer GU- oder U-reichen, stromabwärts liegenden Sequenz liegt, in Wechselwirkung, wodurch eine Schleife entsteht. Neben den Spaltungsfaktoren I und II (CF I+II), die zur Stabilisierung des Komplexes beitragen, bindet die Poly(A)-Polymerase (PAP) an den Multiproteinkomplex und initiiert die Spaltung an der Poly(A)-Stelle. Die Poly(A)-Stelle befindet sich zehn bis 35 Nucleotide stromabwärts des Polyadenylierungs-Signals. Sie stimuliert die Polyadenylierung der durch die Spaltreaktion entstandenen freien 3'-Hydroxylgruppe. In einer langsamen Reaktion fügt die gebundene PAP etwa zwölf Adenosinreste an. Die Bindung des Poly(A)-Bindungsproteins (PABII) an den kurzen Poly(A)-Schwanz beschleunigt die Syntheserate von PAP und vermittelt nach 200 bis 250 Adenosinresten den Polymerisationsstopp. Die Funktionen des Poly(A)-Schwanzes sind noch nicht vollständig erforscht, sicher sind aber eine Erhöhung der Stabilität durch Schutz vor Abbau sowie eine Erhöhung der Effizienz der Translation (ca. 20-fach).

# Einleitung

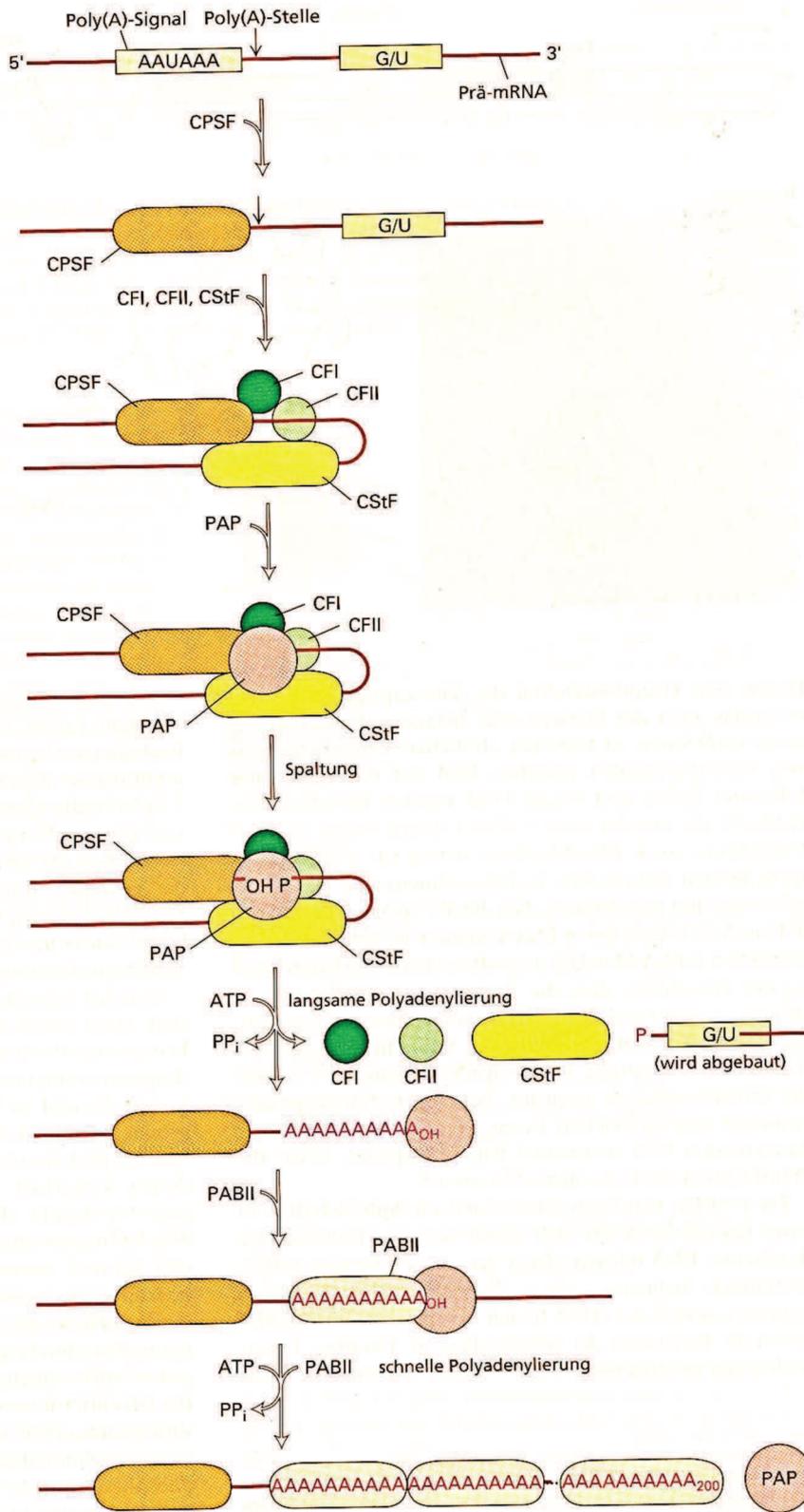


Abb.2.3.4: Modell für die Spaltung und Polyadenylierung von Prä-mRNA in Säugetierzellen [Lodish et al., 2001].

## Einleitung

### 2.3.5 Spleißen

#### 2.3.5.1 Grundlegende Mechanismen und deren Regulation

Es wird davon ausgegangen, dass ein Drittel bis hin zu 59 % aller menschlichen Gene dem Prozess des alternativen Spleißens unterliegen. Fehlregulationen bei diesem Prozess sind häufige Ursache von unterschiedlichen Krankheiten, darunter auch Krebs [Stoss O. et al., 2000 und Faustino N.A. et al., 2003].

Die meisten eukaryotischen prä-mRNAs enthalten nicht-kodierende Sequenzen (Introns), die entfernt werden müssen, um die korrekte Verkettung von exonischen Sequenzen [Kim E. et al., 2008; Licatalosi D.D. et al., 2010] zu erzeugen. Introns machen mehr als 90 % der Länge der prä-mRNAs aus. Das Spleißosom, welches den Vorgang des Spleißens durchführt, muss genau die spezifischen Nukleotidsequenzen an Intron-Exon-Grenzen identifizieren, um die Intron-Exzision und die Exon-Verknüpfung ausführen zu können. Diese regulatorischen Faktoren bestimmen hierbei, wie die fertige mRNA aussehen wird. Durch den Prozess des alternativen Spleißens ergibt sich die Möglichkeit, aus einer prä-mRNA verschiedene reife mRNA-Moleküle zu bilden. Ein Großteil der Vielfalt des Transkriptoms, es wird von mehr als 70 % der menschlichen Gene ausgegangen, wird durch alternatives Spleißen erzeugt [Kim E. et al., 2008; Licatalosi D.D. et al., 2010]. Das Spleißosom besteht aus mehreren Proteinen und fünf small nuclear RNAs (snRNAs, U1, U2, U4, U5 und U6). Dieser Komplex ist in der Lage, eine 5'-Donorspleißstelle, welche mit einem GU-Dinukleotid beginnt, und eine 3'-Akzeptorstelle, welche mit einem AG-Dinukleotid endet und an den Grenzen der Introns liegt, zu erkennen. Darüber hinaus erkennt er auch die so genannte Verzweigungssequenz („branching sequence“), die vor der 3'-Akzeptorstelle liegt. Die 5'-Spleißstelle wird durch die U1 snRNP erkannt, während die Verzweigungssequenz und die 3'-Akzeptorstelle durch die U2 snRNP und deren Hilfsfaktor U2AF erkannt und gebunden werden. Eine Wechselwirkung mit der U4, U6 und U5 snRNPs führt zur Bildung des katalytisch aktiven Komplexes, der die beiden trans-Esterreaktionen katalysiert, welches zur Spaltung und Religation der mRNA-Kette führt.

## Einleitung

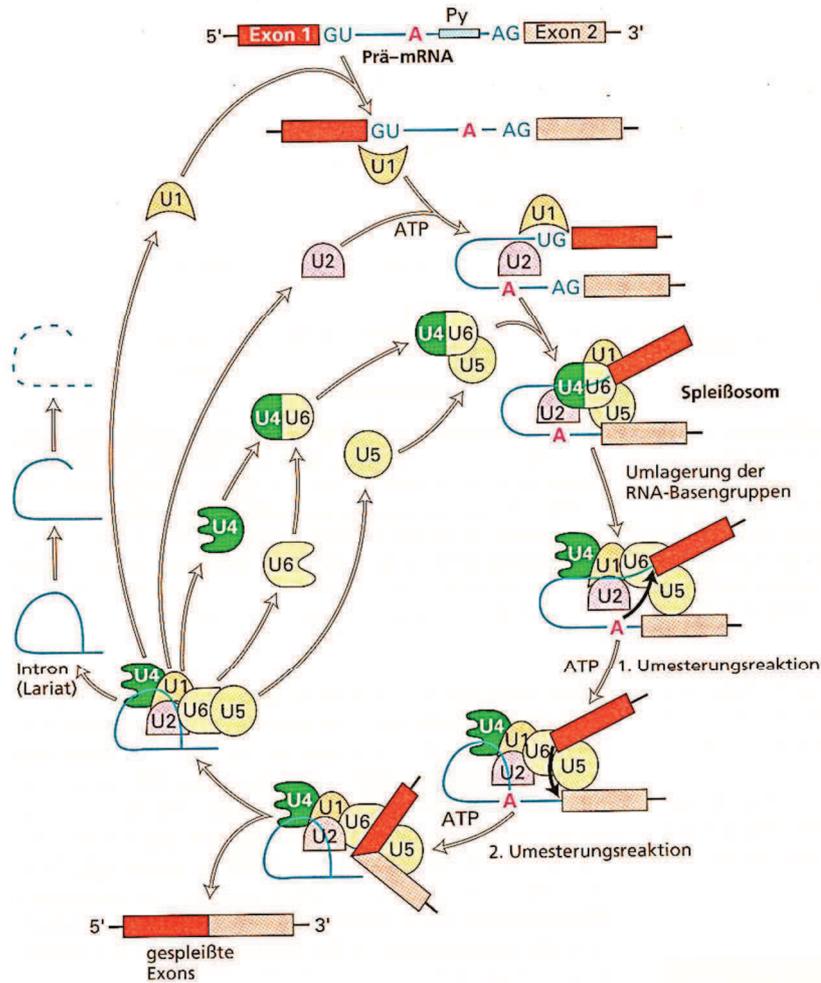


Abb.2.3.5.1.A: Modell für den zyklischen Verlauf beim Spleißen durch ein Spleißosom [Lodish et al., 2001].

Durch Abweichungen von der zuvor genannten Konsensussequenz verringert sich die Affinität der snRNPs, welches zu einer alternativen Auswahl der Exons führen kann. In diesem Fall moduliert eine weitere Klasse von Sequenzelementen den Mechanismus des Spleißosoms, welche als Spleiß-Enhancer und -Silencer bezeichnet werden, die mit einer Länge von etwa zehn Nukleotiden die Exonerkenkung verbessern bzw. unterdrücken. Auch beeinflussen eine Vielzahl von spleißregulatorischen Proteinen und heterogene nukleare Ribonukleoproteine (hnRNP) die Position des Spleißosoms [Licatalosi D.D. et al., 2010; Pettigrew C.A. et al., 2008]. Viele Exons enthalten exonische Spleiß-Enhancer, die um die Spleißstelle geclustert liegen und in besonders hoher Anzahl bei konstitutiven Exons vorkommen. Es wird vermutet, dass das alternative Spleißen durch Enhancer, die beim konstitutiven Exon-Spleißen von Bedeutung sind, und durch Silencer, die das exonische

## Einleitung

Spleißen beeinflussen, kontrolliert wird [Jensen C.J. et al., 2009]. Es werden verschiedene alternative Spleißereignisse beobachtet. Hierzu zählen das „Exon-Skipping“, bei dem das Exon zusammen mit den flankierenden Introns aus dem Transkript gespleißt wird, die alternative 5'- und 3'-Spleißstellen-Auswahl, bei der zwei oder mehr Spleißstellen in einem Exon erkannt werden können, und die Intron Retention, bei der ein Intron in der reifen mRNA bleibt. Weitere Spleißereignisse sind alternative Polyadenylierungssignale, die die Erzeugung von Isoformen mit 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) unterschiedlicher Länge ermöglichen, und die alternative Verwendung von Promotoren mit der Erzeugung von Isoformen mit Promotor-assoziierten Exons. Der Mechanismus des alternativen Spleißens kann folglich dazu führen, dass zahlreiche mRNAs und strukturell verschiedene Proteine aus einem einzelnen Gentranskript entstehen.

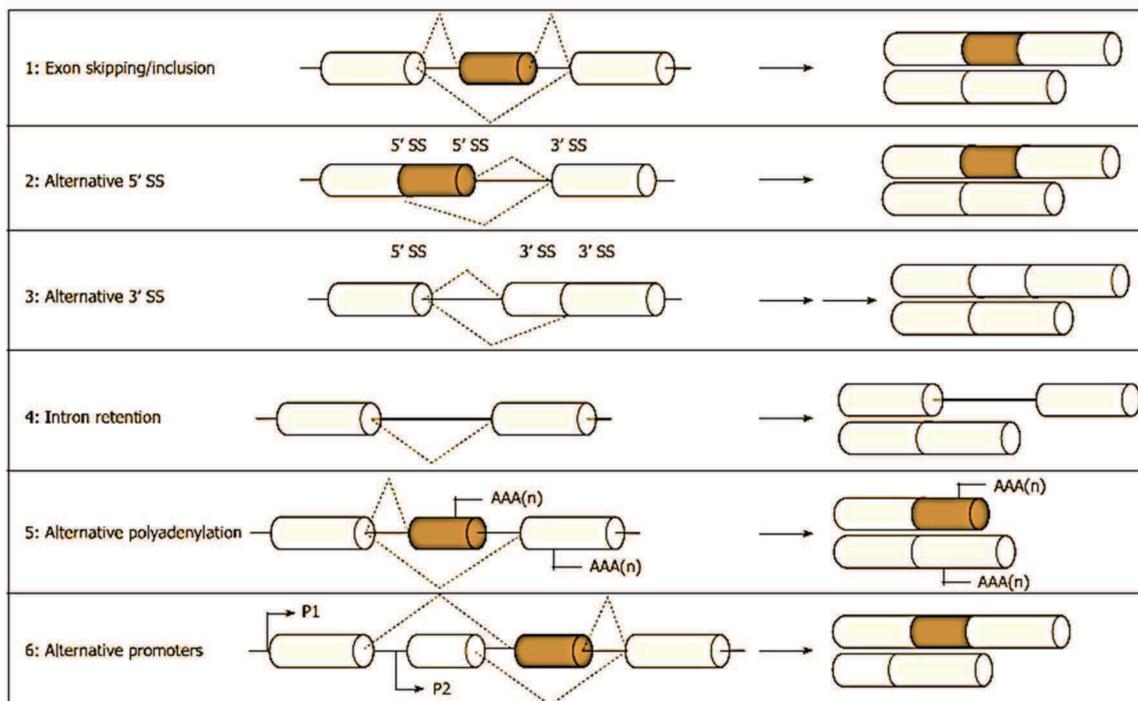


Abb.2.3.5.1.B: Verschiedene Modelle für das alternative Spleißen [Berasain et al., 2010].

Die Veränderungen im Expressionsspiegel von Spleißfaktoren, wie z. B. SR Proteine, „exonic splicing enhancer“ (ESE), „small nuclear ribonucleoproteins“ (snRNPs), „heterogenous nuclear ribonucleoproteins“ (hnRNPs) und „exonic splicing silencer“ (ESS), sind bekannt dafür, dass sie die Spleißstellen beeinflussen und hierdurch einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der Spleiß Varianten in verschiedenen Geweben und zwischen normalen und transformierten Zellen haben [Grosso A.R. et al., 2008 und Pettigrew C.A. et al., 2008]. Als weitere Faktoren, die das alternative Spleißen beeinflussen, wurden extrazelluläre Stimuli

## **Einleitung**

[Shin C. et al., 2004; Blaustein M. et al., 2007], die Phosphorylierung der Spleißfaktoren, extrazelluläre Signale, die die subzelluläre Lokalisation von Spleißfaktoren und die Interaktion mit den prä-mRNAs beeinflussen, sowie extrazelluläre Signalwege, die die Aktivität der Spleißfaktoren kontrollieren, ermittelt [Blaustein M. et al., 2007 und Stamm S. et al., 2008].

### **2.3.5.2 Alternatives Spleißen im HCC**

Der Mechanismus des alternativen Spleißens ist sehr stark reguliert, und eine Vielzahl der humanen Gene durchläuft Spleißprozesse. Eine Störung des Mechanismus wurde bereits mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht, unter anderem mit Leberkrebs. Veränderungen im mRNA-Spleißen sind eine wichtige Ursache von Krankheiten, was dadurch belegt wird, dass 15 % der durch Punktmutationen hervorgerufenen Krankheiten das Spleißen beeinflussen [Wang G.S. et al., 2007].

Krebsspezifische Spleißvariante-Isoformen und krebsrelevante Veränderungen der Konzentration von gespleißten Isoformen konnten ebenfalls eine Beziehung zwischen dem alternativen Spleißen und Krebs aufweisen [Srebrow A. et al., 2006; Kim E. et al., 2008; Grosso A.R. et al., 2008; Pettigrew C.A. et al., 2008; Körner M. et al., 2009]. Für diese Änderungen konnte in einigen Fällen die pro-tumorigene Wirkung direkt nachgewiesen werden.

Es wird zunehmend von Veränderungen im prä-mRNA-Spleißmuster bei Krebs und anderen Krankheiten berichtet [Tazi J. et al., 2009 und Li H.R. et al., 2006]. Die Mechanismen, die zu diesen Veränderungen führen, sind allerdings noch nicht bekannt, beinhalten aber (1) Mutationen, die Spleißstellen, Spleiß-Enhancer oder -Silencer verändern oder zerstören [Srebrow A. et al., 2006], (2) die abnormale Expression von Spleißfaktoren [Kim E. et al., 2008; Grosso A.R. et al., 2008; Karni R. et al., 2007; David C.J. et al., 2010], und (3) die Aktivierung von Signalwegen, die die Aktivität der Spleißmaschinerie beeinflussen [Srebrow A. et al., 2006 und Blaustein M. et al., 2007].

Generell bleibt es schwierig zu unterscheiden, ob die Änderungen im alternativen Spleißen die Ursache oder die Folge der Krankheit sind. Gerade in einer neoplastischen Krankheit wie dem HCC ist diese Unterscheidung schwierig, da der mehrstufige Prozess der Hepatokarzinogenese mit multiplen und heterogenen genetischen Veränderungen einhergeht.

## Einleitung

In einigen Fällen konnte aber das onkogene Potential von Leber-assoziierten Spleiß Varianten und dem Spleiß-Mechanismus bewiesen werden. Auch konnten bereits Krebs-assoziierte Isoformen in präneoplastischen Stadien erkannt werden, die ein Potential zur Malignisation der Leber aufweisen. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die DNA Methyltransferase 3b (DNMT3b), deren Spleiß Variante DNMT3b4 in Lebergewebe mit chronischer Hepatitis, Zirrrose und HCC überexprimiert vorkommt [Saito Y. et al., 2002]. Im Gegensatz zu der in gesunder Leber vorkommenden Variante DNMT3be fehlen der DNMT3b4 Spleiß Variante die konservierten Methyltransferase-Motive IX und X von Exon 21 und somit wohl auch die enzymatische Aktivität. Das Verhältnis von DNMT3b4- zu DNMT3b3-mRNA ist bei chronischer Hepatitis, Zirrrose und HCC signifikant erhöht und korreliert mit dem Ausmaß der DNA-Hypermethylierung der Satelliten-Regionen in Präkanzerosen und HCC. Diese Hypermethylierungen können zu chromosomalen Instabilitäten führen, die als ein frühes Ereignis während der Hepatokarzinogenese betrachtet werden. Es wurden Versuche in HEK293 Epithelzellen gemacht, die DNMT3b3 exprimieren und mit einem DNMT3b4 Expressionsvektor transfiziert wurden. In diesen Zellen wurde die Demethylierung der Satelliten-DNA beobachtet, was zur Hypothese führte, dass das Proteinprodukt von DNMT3b4 mit dem von DNMT3b3 konkurriert [Saito Y. et al., 2002]. Weitere Beobachtungen zeigten, dass eine DNMT3b4-Transfektion zu einer verbesserten Wachstumsrate und zu einer erhöhten Expression von Genen führte [Kanai Y. et al., 2004]. Die Genexpression konnte als transformationsbedingt eingestuft werden, da diese eintrat, bevor es zu chromosomalen Veränderungen kam.

## 2.4 „MYC“

### 2.4.1 Das Protoonkogen *c-Myc*

Das Protoonkogen *c-Myc* wurde als zelluläres Homolog des viralen Onkogens *v-myc*, des „avian leukemia virus (ALV)“ identifiziert, das in Vögeln die leukämische Krankheit Myelozytomatose induziert [Sheiness et al., 1978; Vennstrom et al., 1982]. Die *Myc*-Genfamilie ist evolutionär hoch konserviert, die Mitglieder werden allerdings zelltypspezifisch und zu unterschiedlichen Zeiten exprimiert [Bull et al., 2001]. Die Genfamilie, die in Säugerzellen *c-Myc*, *N-* und *L-Myc* sowie *S-* und *B-Myc* bei Nagern umfasst, ist sehr wahrscheinlich durch Genduplikationen entstanden. Die Proteine besitzen Regionen mit hoher Sequenzhomologie, worauf sich die funktionelle Verwandtschaft zurückführen lässt [Henriksson und Lüscher, 1996].

## Einleitung

### 2.4.2 Struktur und Funktion

Das humane *c-MYC*-Gen besteht aus drei Exons und ist auf dem Chromosom 8q24 lokalisiert [Steiner et al., 1996]. Seine Translation kann an einem von drei Promotoren initiiert werden, wobei in 75-90 % der Fälle der Promotor P2 benutzt wird, der zur Expression zweier Proteine von 64 und 67 kDa führt [Henriksson und Lüscher, 1996]. Das Protein MYC wird von Exon 2 und 3, welche den offenen Leserahmen darstellen, codiert. Das Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der aus verschiedenen Domänen, unter anderem aus dem basischen Helix-loop-Helix/Leuzin-Zipper (bHLH/LZ), aufgebaut ist. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) enthält zwei der vier hoch konservierten MYC-Boxen (MB1 und MB2), die essentiell sind für die Transkriptionsaktivität und für die weiteren biologischen Funktionen wie Zellzyklusprogression, Induktion der Apoptose sowie Zelltransformation [Adhikary und Eilers, 2005]. Seine Funktion als Transkriptionsfaktor übt das Protein *c-MYC* ausschließlich als Heterodimer-Komplex mit dem bHLH/LZ-Protein MAX (MYC associated Factor X) aus, mit dem es an die kanonische E-box-Sequenz 5'-CACGTG-3' und andere Sequenzen bindet [Blackwood und Eisenman, 1991; Ma et al., 1993]. In *Drosophila* konnte allerdings dokumentiert werden, dass Myc diese Funktion auch in Abwesenheit von Max erfüllen konnte [Steiger et al., 2008]. Wie diese Regulation der Transkription ohne Max erfolgt, ist allerdings noch unklar. Die Aktivierung der *c-MYC*-Zielgene erfolgt über die N-terminale TAD, mit der *c-MYC* direkt auf Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie einwirkt. Alternativ kann *c-MYC* die Transkription durch Chromatin-Modifikationen und Chromatin-Remodelling positiv beeinflussen. Dies kann zum Beispiel auch über die Bindung der MYC/MAX-Dimere an die E-Box-Sequenz stattfinden, wobei eine Komponente des SWI/SNF-Komplexes durch MYC rekrutiert wird. Diese Komponente besitzt eine ATPase-Aktivität, die ein Chromatin-Remodelling bewirkt, welches die Chromatin-Struktur für weitere transkriptionelle Regulatoren und die RNA-Polymerase II zugänglich macht. Ferner kann MYC mit TRRAP-Komplexen (transformation/transcription domain-associated protein) interagieren, welche eine Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität (HAT-Aktivität) besitzen, die zur Acetylierung von Histonen führt. Eine verstärkte Histon-Acetylierung fördert die Bindung des Präinitiations-Komplexes an den aktiven Promotor und leitet so den Start der Transkription ein [Gregory et al., 2001]. Die MB1 umfasst zwei Phosphorylierungsstellen, die den Abbau durch das 26S-Proteasom regulieren [Sears et al., 2000; Thomas und Tansey, 2010; Popov et al., 2007; Popov et al., 2010]. Des Weiteren konnte in einem Reporterassay gezeigt werden, dass die MB1 die Transaktivierung mit beeinflussen kann [Amin et al., 1993]. Die MB2 stellt die Binderegion für mehrere

## Einleitung

Kofaktoren und Kofaktor-Komplexe [Li et al., 1994]. Auch eine Regulation der MYC-Zielgene kann über die MB2 erfolgen [Nikiforov et al., 2002]. Die MB3 und MB4 befindet sich in der zentralen Region des Proteins, ist ebenfalls hoch konserviert und für die transkriptionelle Repression und Transformation sowie als negativer Regulator der Apoptose durch c-MYC erforderlich [Herbst et al., 2005]. Ebenfalls in der zentralen Region befinden sich zwei Kernlokalisations-signale (Nuclear Localisation Signal, NLS), die für die Lokalisation von c-MYC in den Zellkern erforderlich sind [Dang und Lee, 1988].

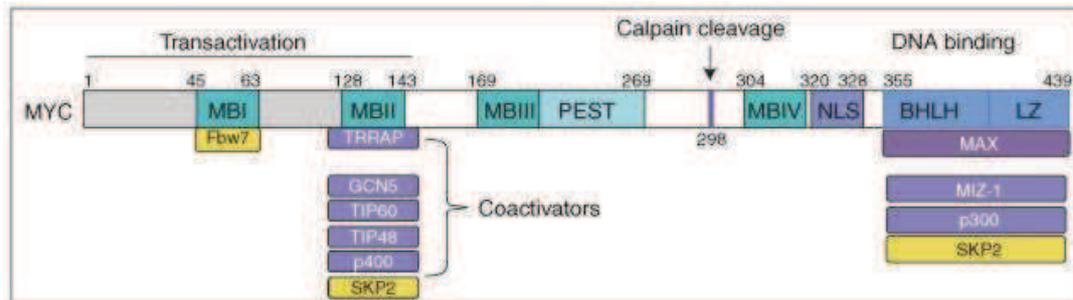


Abb.2.4.2 A: Struktur und Proteininteraktion der *Myc*-Genfamilie [Conacci-Sorrell et al., 2014]

Die transkriptionelle Regulation durch c-MYC erfolgt über die Bildung des Heterodimer-Komplexes mit MAX. Während c-MYC nur in proliferierenden Zellen mit einer Halbwertszeit von 20-30 min exprimiert wird, wird MAX konstitutiv und in einer höheren Konzentration exprimiert. Alternativ zu c-MYC kann MAX auch mit Mitgliedern der MAD-Familie einen Komplex bilden, welcher antagonistisch zum c-MYC-Komplex ist. MAD Proteine sind in nicht-proliferierenden oder differenzierenden Zellen exprimiert und sind in der Lage, die Transkription zu reprimieren. Hierzu wird die Histon-Deacetylierungsaktivität (HDAC), die mit dem Sin3-abhängigen Repressor-Komplex assoziiert ist, über die N-terminale SID-Domäne (sin3-Interaktions-Domäne), die mit dem mSin3-Protein interagiert, rekrutiert [Henriksson und Lüscher, 1996]. Es wird davon ausgegangen, dass die Repression Zielgen-abhängig ist. Ein Beispiel für die Repression der Transkription ist die Inaktivierung von MIZ-1, dessen Aktivität sowohl durch die Interaktion von c-MYC/MAX als auch durch die Rekrutierung der Histon-Acetyltransferase p300 verhindert wird [Herold et al., 2002; Staller et al., 2001]. Die Rekrutierung der DNA-Methyltransferase DNMT3a durch c-MYC deutet ferner darauf hin, dass die Repression der Transkription auch über die Methylierung der Zielgenpromotoren erfolgt [Brenner et al., 2005]. Ferner zeigt sich eine c-Myc vermittelte Repression von *Tmeff2*, welches ein Transmembranprotein und einen Tumorsuppressor kodiert, die über eine direkte DNA-Interaktion an der E-box erfolgt. Das Gen *p27* wird durch

## Einleitung

die Bindung des c-MYC/MAX-Heterodimerkomplexes an den Transkriptionsstart dieses Genes reprimiert.

Die weiteren biologischen Funktionen werden über diese Regulation der Expression zahlreicher c-MYC-Zielgene ausgeübt. Es wurden bisher mehr als 1000 Zielgene beschrieben, die in Genchip-, SAGE- (serial analysis of gene expression) und ChIP- (Chromatin-Immunopräzipitation) Analysen (Hochdurchsatz-Screens) ermittelt wurden [Patel et al., 2004]. In vielen MYC-Zielgenen wurde lediglich eine schwache Induktion beschrieben. Dies und der formale Beweis, dass es sich um ein unmittelbar durch c-MYC reguliertes Gen handelt, machen die Identifikation schwierig, gerade, weil Studien davon ausgehen, dass c-MYC 15 % der Gene innerhalb des Genoms bindet und deren Expression direkt beeinflusst [Knoepfler PS., 2007]. Für die Identifikation eines direkten c-MYC-Zielgens wurden verschiedene Kriterien und Richtlinien aufgestellt [Henriksson und Lüscher, 1996]. So soll die Expression des Zielgens unmittelbar auf eine c-MYC-Aktivierung erfolgen und die Expression von Mutationen der MYC-Funktion abhängig sein. Als ein strenges Kriterium für direkte c-MYC-Zielgene gilt die Fähigkeit, MYC in ChIP-Analysen an den Consensus-Bindestellen nachweisen zu können. Ferner muss bei der Identifikation von c-MYC-Zielgenen beachtet werden, dass physiologisch zu hohe MYC-Level Zielgene aktivieren können, die unter physiologischen Bedingungen nicht aktiviert würden. Durch diese Bedingungen könnte es in den Zellsystemen zu adaptiven Effekten bezüglich der mRNA-Mengen kommen. Auch ist das Verhältnis von aktivierten und reprimierten Genen je nach verwendetem Zellsystem unterschiedlich, es wird davon ausgegangen, dass zehn bis 25 % der c-MYC-Zielgene reprimiert werden [Zeller et al, 2003]. Neben den Protein-kodierenden Genen spielen auch rRNA-, tRNA-kodierende Gene und mikroRNAs eine Rolle, die durch c-MYC aktiviert an der Regulation von Zielgenen beteiligt sind. Letzteres wurde am MYC-aktivierten Zielgen *E2F1* gezeigt, welches über die Induktion einer MYC-regulierten mikroRNA negativ reguliert wird [O'Donnell et al., 2005]. Als indirekte Zielgene werden die Gene bezeichnet, die durch die c-MYC-induzierte Zellzyklusprogression reguliert werden, ihre Anzahl kann nur abgeschätzt werden. Viele Ergebnisse und die hohe Anzahl an c-MYC-Zielgenen deuten darauf hin, dass die biologische Funktion von c-MYC nicht über einen kritischen Effektor reguliert, sondern über das breite Spektrum der Zielgene vermittelt wird [Bernard und Eilers, 2006]. Die Induktion der *c-MYC*-mRNA sowie des c-MYC-Proteins sorgen bei ruhenden Zellen zu einem Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus [Amati et al., 2001, Dang et al., 1999]. Ferner steuert c-Myc den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus [Fernandez et al., 2003 und Schuhmacher et al., 2001] durch die Aktivierung von Cdk4 und

## Einleitung

CyclinD2. Hierdurch wird der Cyclin/Cdk-Inhibitor p27 durch Phosphorylierung inaktiviert und der Komplex aus CyclinE und Cdk2 aktiviert. Auch die Cyclin/Cdk-Inhibitoren p15 und p21 werden durch c-Myc inhibiert. Dies führt zur Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins Retinoblastom (Rb), welches den G1/S-Übergang kontrolliert. Allerdings konnte in primären Leberzellen von Mäusen durch die Expression eines exogenen *Myc*-Gens das Wachstum von Hepatozyten gefördert werden, ohne Proliferation oder Apoptose auszulösen [Kim et al., 2000]. Dies weist darauf hin, dass Myc ein Wachstumsprogramm unabhängig von der Aktivierung des Zellzyklus auslösen kann.

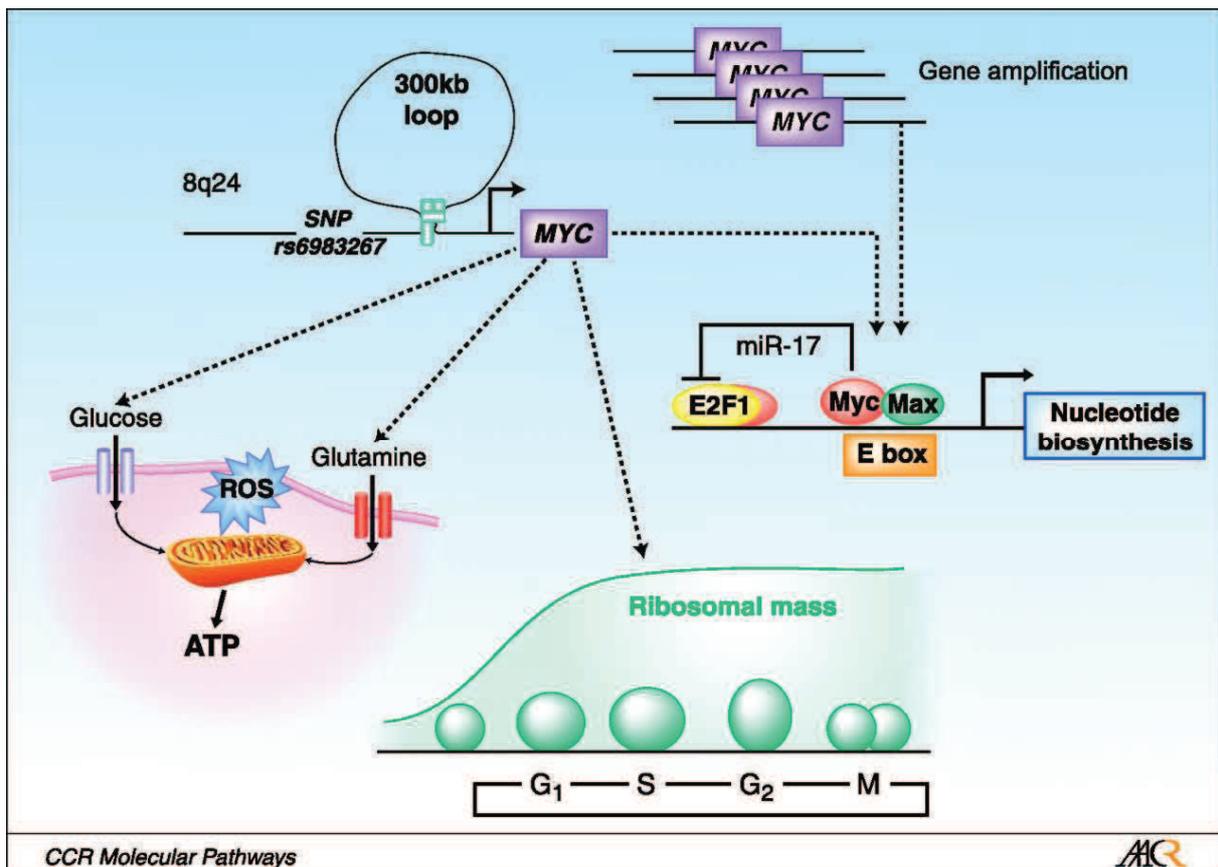


Abb.2.4.2 B: Zeigt die veränderte MYC Expression und Myc Funktion. Wenn SNP r6983267 an den MYC-Promotor bindet, verändert es dessen Expression. Myc wiederum regelt den Energiestoffwechsel und die ribosomale Biogenese, die den Großteil der Zellmasse durch den Zellzyklus liefert. Beim Eintritt der Zellen in die S-Phase reguliert Myc zusammen mit E2F1 den Nucleotidmetabolismus. Myc reguliert E2F1 über miR-17 in einer negativen Schleife, welches eine sichere Passage durch die DNA-Replikation abschwächt [Dang et al., 2009].

Ferner kann c-MYC auch den programmierten Zelltod einer Zelle aktivieren, sie aber auch immortalisieren. Die Aktivierung von p19ARF durch c-MYC führt in Abwesenheit von

## Einleitung

Überlebensfaktoren wie PDGF (Platelet-derived growth factor) und IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) durch die Interaktion mit p53 und MDM2 zur Apoptose [Zindy et al., 1998]. Eine Immortalisierung erreicht das Protein c-MYC durch die Überexpression von hTERT, was die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert. Das verstärkt die Telomeraseaktivität und bewirkt so den Schutz der Telomere [Wang et al., 1998]. Darüber hinaus erfolgt eine Immortalisierung durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *p53* und *pRb* [Kiyono et al., 1998]. Ferner wird davon ausgegangen, dass c-MYC die RAS-vermittelte Seneszenz aufhebt und RAS der c-MYC-abhängigen Apoptose entgegenwirkt [Hydbring und Larsson, 2010]. Die beiden Protoonkogene MYC und RAS fördern das Zellwachstum. Wenn diese jedoch dereguliert vorliegen, kommt es zur Entwicklung von Tumoren. Allerdings aktivieren sie auch intrinsische Tumorsuppressor-Mechanismen, die Apoptose und Seneszenz auslösen. Die Aufhebung der RAS-vermittelten Seneszenz wird erreicht durch die Phosphorylierung von c-MYC durch die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2). Mit CDK2 als Kofaktor reguliert c-MYC weitere Schlüsselgene in der Seneszenz. Eine selektive pharmakologische Hemmung der CDK2 kann MYC/RAS-exprimierende Zellen in die Seneszenz führen und bietet damit ein therapeutisches Ziel für die Behandlung von MYC- oder RAS-abhängigen Tumoren. Weitere Ergebnisse zeigten, dass in einem Mausmodell für Osteosarkome nach erneuter Aktivierung von c-Myc Apoptose induziert wurde [Jain et al., 2002], die Zellen aber nicht in ihr vorheriges Tumorstadium eintraten. Dieses und andere Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Inhibierung von c-Myc bei der Tumorthherapie von Bedeutung sein kann.

### 2.4.3 Regulation von „MYC“

Eine Regulation der Expression von MYC ist von entscheidender Bedeutung, da es über die Vielzahl der Zielgene eine ebenso große Vielzahl von Funktionen ausübt. Da der Heterodimerisationspartner MAX ubiquitär exprimiert wird und im Gegensatz zu MYC über eine deutlich längere Halbwertszeit verfügt (MYC: RNS~30 min, Protein~20 min; MAX: RNS~3 Std., Protein <24Std.) [Hann und Eisenmann, 1984], wird ersichtlich, dass MYC die limitierende und damit auch die regulierende Komponente des Komplexes ist und die Bedeutung dessen Regulation in den Fokus rückt.

Das Protoonkogen *MYC* ist ein „early response-Gen“ (schnelles Antwortgen), welches stromabwärts vieler Liganden-Membran-Rezeptor-Komplexe und deren Rezeptor-Signaltransduktionswegen liegt [Armelin et al., 1984; Kelly et al., 1983]. Dadurch erfolgt eine

## Einleitung

positive oder negative Regulation von MYC. Ferner wird das Expressionsniveau durch eine Reihe von Mechanismen kontrolliert. Viele der Transkriptionsregulationsmotive von *MYC* konnten in seiner proximalen Promotorregion gefunden werden [Brooks und Hurley, 2010; Hurley et al., 2006; Levens, 2010]. Viele Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel CNBP, FBP und TCF, die abwärts des WNT-Signalweges liegen, kontrollieren die Transkription von *MYC*. Wie bereits zuvor erwähnt, kann das Protein *MYC* über Phosphorylierungen am Ser-62 und/oder Thr-58 posttranslational modifiziert werden, was dessen Halbwertszeit beeinflusst. Ferner findet auch eine Regulation über non-B-DNA-Strukturen statt, wie „single-standed bubbles“ (Einzelstrang-Blasen), G-Quadruplex- und Z-DNA-Strukturen [Levens, 2010]. FUSE (Far UpStream Element) bewirkt durch die Bindung mit FBP (FUSE-Bindungsprotein) ein Schmelzen des Doppelstranges, was die Torsionsspannung auf die DNA bei der Transkription von *MYC* entlastet [He et al., 2000].

Neben dem *MYC*-Protoonkogen unterliegen auch die mRNA und das Protein einer starken Kontrolle. Die mRNA von *MYC*, die nur über eine kurze Halbwertszeit verfügt, wird durch mikroRNAs (let-7, miR-34 und miR-145) durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst [Cannell et al., 2010; Christoffersen et al., 2010; Kim et al., 2009; Kress et al., 2011; Sachdeva et al., 2009].

### 2.4.4 Bedeutung von „MYC“ in der Karzinogenese

Bereits frühe in vivo Studien zeigten das onkogene Potential von *MYC* durch den Nachweis, dass *MYC* normale embryonale Fibroblasten mit weiteren Onkogenen transformieren konnte [Land et al., 1983]. Nachfolgende Mausstudien wiesen nach, dass die Deregulation von *Myc* ausreicht, um die Tumorigenese in einer Reihe von transgenen Mausgeweben zu erzwingen [Adams et al., 1985; Chesi et al., 2008; Leder et al., 1986]. Ferner konnte eine retrovirale Insertionsmutagenese *c-Myc* als murines Hauptonkogen identifizieren [Akagi et al., 2004]. Allerdings zeigte sich in jedem dieser Modelle, dass *Myc* weitere genetische Veränderungen benötigt, um sein tumorigenes Potential zu entwickeln. So löst eine transgene *Myc*-Expression bei *K-ras* Mutationen einen aggressiven Tumor aus [D’Cruz et al., 2001]. In Lymphomen konnten Störungen der Funktion von *Arf* oder *p53* und eine *Myc*-Überexpression identifiziert werden [Eischen et al., 1999; Zindy et al., 1998]. *Myc* ist eines der am stärksten exprimierten Onkogene, welches in vielen verschiedenen menschlichen Krebsarten vorkommt [Beroukhim et al., 2010]. Es wird geschätzt, dass 70 % aller humanen Tumore auf eine Fehlregulation des *MYC*-Gens zurückzuführen sind. In den meisten dieser Tumore liegt die

## Einleitung

Überexpression an einer Translokation des *c-MYC*-Gens. Beispielsweise liegt beim Burkitt-Lymphom eine Translokation von Chromosom 8 auf die Immunglobulin (Ig)-Loci der leichten Kette auf Chromosom 2 oder 22 vor oder auf den Locus der Ig-Schwerketten auf Chromosom 14 [Klein et al., 1999, Shou et al., 2000]. Aber auch Mutationen wie die an den Phosphorylierungsstellen des c-MYC-Proteins (Threonin 58, Serin 62) können eine Ursache für die Tumorentstehung sein [Nesbit et al., 1999; Niklinski et al., 2000]. Mutationen dieser Art konnten im Burkitt-Lymphom identifiziert werden, wo diese Mutationen zu einer Stabilisierung des MYC-Proteins führen. Da die Phosphorylierungen zur Auflösung der alpha-Tubulin-Bindung führen, wird MYC nicht mehr im Zytoplasma sequestriert und kann daher nicht abgebaut werden, was eine erhöhte Stabilisation der mutierten MYC-Proteine bedeutet. Die Mutationen in der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) der mRNA von *c-MYC* führt zu einer verstärkten Assoziation mit den Polysomen, was die Translation der *MYC*-mRNA fördert [Willis et al., 1997; Salghetti et al., 1999; Thomas und Tansey, 2010; Wang et al., 2011]. Auch Defekte der Transkription stromaufwärts von *MYC*, wie etwa des WNT-APC-Signalweges, führen zu einer erhöhten TCF-Transkription, die eine Aktivierung von *MYC* hervorruft [He et al., 1998]. Des Weiteren konnten ein deregulierter Notch-Signalweg und eine Fehlregulation von MYC in T-Zell-Leukämie festgestellt werden [Palomero et al., 2006; Sharma et al., 2006; Weng et al., 2006]. Ferner wurden Polymorphismen in der Nähe des *MYC*-Gens gefunden, die mit einer Vielzahl von Krebsarten assoziiert werden konnten [Ahmadiyeh et al., 2010; Tuupanen et al., 2009; Wasserman et al., 2010]. Diese „small nuclear polymorphisms“ (SNPs) liegen im Bereich der Enhancers, die in die Bindung von TCF und die Ausbildung von DNA-Loops involviert sind, wodurch der Enhancer an den proximalen Promotor von *MYC* binden kann [Pomerantz et al., 2009; Sotelo et al., 2010; Wright et al., 2010]. Es konnte für die BET-Domäne durch einen chemischen Inhibitor der Domäne in vivo die Tumorigenese inhibiert werden [Delmore et al., 2011; Mertz et al., 2011]. Die BET-Domäne umfasst transkriptionelle Regulatoren wie zum Beispiel BRD4, welches an die *MYC*-Promotorregion bindet und dadurch dessen Expression beeinflusst.

## 2.5 Thematische Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor c-Myc stellt seit seiner Identifizierung 1982 [Vennstrom et al., 1982] bis heute ein interessantes Forschungsgebiet dar. Dies liegt vor allem daran, dass c-Myc eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle übernimmt und es bei der Tumorentwicklung eine

## Einleitung

bedeutende Rolle spielt. Bislang sind die karzinogene Wirkung und Funktion von c-Myc nicht abschließend geklärt, allerdings gibt es viele Ergebnisse, die Möglichkeiten für eine Krebstherapie eröffnen. Die Aufklärung der Funktionen und Wirkungsweise des Proteins ist demnach entscheidend für eine erfolgreiche Krebstherapie. Ein wichtiger Aspekt dabei ist die Identifikation von Genen, die das Potential zur malignen Transformation besitzen. Hierzu wurden genomweite Analysen der Genexpression in einem c-Myc-überexprimierenden Mausmodell durchgeführt. Dies sollte dazu beitragen, aus der Vielzahl der potentiellen c-Myc-Zielgene funktionelle Gruppen von Genen herauszufiltern, die eine veränderte Genexpression besitzen oder durch alternatives Spleißen reguliert sind. Diese Gruppen können zur Aufklärung der Wirkungsweise von c-Myc beitragen und weiterhin eine Identifikation von Genen zulassen, die das Potential zur malignen Transformation besitzen. Ein besonderes Interesse wurde dabei auf regulatorische Netzwerke gelegt, die mit der malignen Transformation verknüpft sind, insbesondere die Regulation von Transkriptionsfaktoren und das differentielle Spleißen. Da eine Früherkennung des Leberkarzinoms die Heilungschancen deutlich verbessert, wurden bei dem transgenen Mausmodell die fortlaufenden Entwicklungsstadien des Leberkrebses untersucht. Eine Aufklärung dieser Entwicklungsstadien kann zu einer verbesserten Diagnostik führen. Es wurden hierzu gesunde Leberzellen sowie die Entwicklungsstadien Dysplasie und HCC mittels Laser-Mikrodissektion isoliert und für Microarray-Experimente sowie qRT-PCR-Analysen aufbereitet, was eine genomweite Analyse der fortlaufenden Tumorentwicklung ermöglichte. Exon-Array-Analysen ermöglichten neben Genexpressionsanalysen auch die Analyse auf differentielles Spleißen.

Die Aufklärung der molekularen Veränderungen, die mit der malignen Transformation einhergehen, kann sowohl als Grundstein einer Früherkennung von Leberkrebs als auch als Ansatzpunkt einer Therapie dienen. Die Analyse des c-myc-überexprimierenden Mausmodells kann als vielversprechend gelten, da Mensch und Maus 99 % ihrer Gene gemeinsam haben und so in der Maus die vielfältigen Funktionen des c-Myc-Gens und die sich durch dieses Protoonkogen verändernden Prozesse darstellen lassen. Hierdurch ist auch die fortschreitende Entwicklung zum HCC auf molekularer Ebene zu analysieren.

## Material und Methoden

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Kits

Tabelle 3.1.1: Chemikalien und Kit Liste

1 kb plus Ladder	Invitrogen
1 M Salzsäure (HCL)	Merck Millipore
100 bp DNA Ladder	Invitrogen
2',7'-dichlorofluorescin diacetate; H2DCFDA	Invitrogen
20 % Ficoll	Sigma Aldrich
20xSSPE-Lösung	AccuGene
4x Roti-Load	Carl Roth
ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Fisher
Acetyliertes BSA	Invitrogen
Agarose NEEO	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck Millipore
AmpliTaQ®FS Big Dye Terminator Kit	PE AppliedBiosystems
Ampuwa Injektionswasser	Wilke & Wilke
Aprotinin	Sigma Aldrich
Benzonase (10000 Units)	Merck Millipore
Bicinchoninic Acid-Lösung (BCA), Fa. Sigma, Art. Nr. B 9643	Sigma Aldrich
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Bio-Lyte 3-10	BioRad
BioRad Protein Assay Dye Reagent	BioRad
Bovine $\chi$ -globulin	BioRad
Bovine Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Fa. PAA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Bromphenolblau Na-salt	Serva
CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
CHAPS (w/v)	Carl Roth
c-Myc Recombinant Protein	Novus Biologicals

## Material und Methoden

Complete™	Roche
Cycle Test TM Plus DNA Reagent Kit	BD Biosciences
D-(+) Glucose	Sigma Aldrich
Diethylpyrocarbonat	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (=DTT)	Carl Roth
DMSO p.A.	Merck Millipore
dNTP's	Thermo Fisher
Dulbecco's MEM (1x) Kulturmedium w 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> , w 4,5 g/L, D-Glucose, w/o L-Glutamin, w/o Na-Pyruvat	Biochrom
enhanced chemiluminescence ECL Lösung	Amersham-Pharmacia Biotech
Eosin B-Lösung	Merck Millipore
Essigsäure 100 % p.A.	Carl Roth
Ethanol absolut p.A.	Merck Millipore
Ethidiumbromidlösung 1 %ig	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich
FACS Flow Sheath Fluid	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson
FCS (foetal calf serum, FCS Gold)	PAA
GeneChip IVT cRNA Cleanup Kit	Affimetrix
GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit	Affimetrix
GeneChip® Hybridization, wash and stain Kit	Affimetrix
GeneChip® IVT Labeling Kit	Affimetrix
GeneChip® One-Cycle cDNA Synthesis Kit	Affimetrix
GeneChip® Sample Cleanup Module	Affimetrix
GeneChip® WT cDNA Synthesis Kit	Affimetrix
Glycerin 99 – 100,5 %	Merck Millipore
Glycin PUFFERAN® ≥99 %, p.a.	Carl Roth
Hämatoxylin (Gill II)	Sigma Aldrich

## Material und Methoden

Harnstoff	Carl Roth
Hepes	Sigma Aldrich
Immu Mount Eindeckmittel	Fisher Scientific
Isopropanol 99 %ig	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich
Kupfersulfatlösung (CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O), Fa. Roth, Art.-Nr. P023.1	Carl Roth
L-Glutamin, 200 mM	PAA
Magnesiumchlorid (MgCL <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich
Marker	Chemicon
MES sodium Salt	Sigma Aldrich
Methanol, reinst	Merck Millipore
Milchpulver	Merck Millipore
Mouse Genome 430.A2 Array	Affimetrix
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
NaOH-Pellets	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Natrium-Pyruvat-Lösung 100 mM	PAA
Non-essential amino acids solution 100x	Biochrom
Omniscript RT Kit	Quiagen
PBS	PAA
PCR clean up / Gel clean	Quiagen
Pefabloc	Sigma Aldrich
Penicillin / Streptomycin,100x	PAA
polydeoxyinosinic-Deoxycytidylic Acid= poly (dI/dC), 10 units	Sigma Aldrich
Precision Plus Protein™ Prestained Standard	BioRad
Protein Assay Dye Reagent	BioRad
Protein Standard 1 mg/mL BSA, Fa. Sigma, Art. Nr. P0914	Sigma Aldrich
QIAquick PCR Purification/ Gel Extraction Kit	Quiagen

## Material und Methoden

rhHGF	R&D Systems
RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit	Invitrogen
RLT-Puffer	Qiagen
RNA 6000 Nano Kit	Agilent
RNA 6000 Pico Kit	Agilent
RNase-Free DNase	Qiagen
RNeasy Micro Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rotiblock	BioRad
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
Salzsäure, 37 %ig (HCl)	Merck Millipore
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck Millipore
Streptavidin-Phycoerythrin	Invitrogen
Sucrose	Sigma Aldrich
SYBR Green I Gebrauchslsg.	Thermo Fisher
Taq Polymerase	Thermo Fisher
TBE (5x)	AppliChem
TEMED	Carl Roth
Thermo-Start Taq	Abgene
Thioharnstoff	Carl Roth
TRIS	Carl Roth
Tris 99,9 %	Carl Roth
Trypanblau-Lösung	PAA
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Gibco
Tween 20	Carl Roth
Xylencyanol	Carl Roth
β-Mercaptoethanol	Carl Roth

## Material und Methoden

### 3.1.2 Radioaktive Isotope

Für die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden wurde P32 der Firma Emersham verwendet.

### 3.1.3 Antikörper

Tabelle 3.1.3 A: Primäre Antikörperliste

Bezeichnung	kDa	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Agt I/II (sc-7419)	8-10,60	goat pAb	1/100	Santa Cruz
Apoa4 (sc-19036)	46	goat pAb	1/100	Santa Cruz
Apoc2 (sc-19011)	11	goat pAb	1/100	Santa Cruz
Aqp4 (sc-20812)	34	rabbit pAb	1/100	Santa Cruz
Arg1 (sc-18351)	41	goat pAb	1/200	Santa Cruz
Cdc2a (sc-8395)	34	mouse mAb	1/200	Santa Cruz
Cebpa (sc-9315x)	42	rabbit pAb	1/1000	Santa Cruz
Cebpb (sc-150x)	45	rabbit pAb	1/1000	Santa Cruz
Ets2 (sc-351x)	55	rabbit pAb	1/100	Santa Cruz
Gas1 (sc-9587)	45	rabbit pAb	1/100	Santa Cruz
GR (sc-8992x)	90,95	rabbit pAb	1/1000	Santa Cruz
Gstm2 (ab53940)	26,31	goat pAb	1/1500	Abcam
HNF1a (sc-6547x)	79-92	goat pAb	1/1000 1h RT	Santa Cruz
HNF1b (sc-7411x)	61	goat pAb	1/1000 1h RT	Santa Cruz
HNF3a (sc-6553x)	49	goat pAb	1/1000 1h RT	Santa Cruz
HNF3b /FoxA2 (sc-6554x)	46	goat pAb	1/1000	Santa Cruz
HNF3g (sc-5361x)	37,6-45	goat pAb	1/100 1h RT	Santa Cruz
HNF4a (sc-6556x)	54	goat pAb	1/1000 1h RT	Santa Cruz
HNF6 (sc-6559x)	51	goat pAb	1/1000 1h RT	Santa Cruz
Hsp90aa1 (sc-13119)	90	mouse mAb	1/100	Santa Cruz
Jun (sc-822)	39	mouse mAb	1/100	Santa Cruz
Max (sc-765x)	26	rabbit pAb	1/1000	Santa Cruz
Myc (sc-764,sc-764x)	67	rabbit pAb	1/500 1h RT	Santa Cruz
Myc Antisera	67	rabbit	EMSA 1µl	Hartl, Innsbruck
Orml	24	goat (raw serum)	1/200	Fitzgerald Industries International
Pck1 (PEPCK, sc-	62	rabbit pAb	1/100	Santa Cruz

## Material und Methoden

32879)				
Pla2g6 (sc-58363)	85-114	mouse mAb	1/100	Santa Cruz
Pparg (sc-7196x)	67	rabbit pAb	1/1000	Santa Cruz
Tbx3 (sc-17871x)	~37,65, 100	goat pAb	1/2000	Santa Cruz
Trp53 (sc-6243)	53	rabbit pAb	1/333	Santa Cruz

\*Sollte bei der Verdünnung keine Zeit angegeben sein, so wurden die AK bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 3.1.3 B: Primäre Antikörperliste der „Housekeeping“ Gene

Bezeichnung	kDa	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Actin (sc-1616)	43	goat pAb	1/200	Santa Cruz
GAPDH (sc-25778)	37	rabbit pAb	1/200	Santa Cruz
$\alpha$ Tubulin (sc-58667)	55	mouse mAb	1/200	Santa Cruz
$\beta$ Tubulin (sc-9104)	55	rabbit pAb	1/200	Santa Cruz

\*Sollte bei der Verdünnung keine Zeit angegeben sein, so wurden die AK bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 3.1.3 C: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
goat anti-rabbit IgG – HRP (sc-2004)	Santa Cruz	1/5.000
goat IgG – HRP (sc-2350)	Santa Cruz	1/5.000
normal goat IgG (sc-2028)	Santa Cruz	1/10.000
normal rabbit IgG (sc-2027)	Santa Cruz	1/10.000
normal rat IgG (sc-3883)	Santa Cruz	1/10.000

\*Die sekundären AK wurden für maximal 1h bei RT inkubiert.

### 3.1.4 Oligonukleotide

#### 3.1.4.1 EMSA-Oligos

Die Oligonukleotide wurden so designt, dass diese die DNA-Bindungsdomäne, welche fünf Nukleotide umfasst, und acht flankierende Nukleotide beinhaltet. Für die Kompetition wurden die Sequenzen mutiert. Hierzu wurde von der DNA-Bindungsdomäne mindestens das zentrale Nukleotid verändert. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

## Material und Methoden

Tabelle 3.1.4.1: Tabelle aller benutzten EMSA-Oligos

Gene	Oligo-sequence (wild type)	Oligo-sequence (mutation)
Bola2	CCAGCCAC <b>CACGT</b> GCTGGCCC	CCAGCCAC <b>CGCAT</b> GCTGGCCC
C9	ATGCCCGC <b>CACCT</b> GTCACTAT	ATGCCCGC <b>CATCT</b> GTCACTAT
Cfh	GCTGTCAC <b>CACGT</b> GACCGGAT	GCTGTCAC <b>CATGT</b> GACCGGAT
Fhit	TTATACTC <b>CACCT</b> GACCCCA	TTATACTC <b>CGCTT</b> GACCCCA
Gas6	ATGCAAAC <b>CACCT</b> GACCTCCA	ATGCAAAC <b>CATCT</b> GACCTCCA
Ly6d	TAGAGGCC <b>AAGTG</b> ATGGCTCC	TAGAGGCC <b>AAATG</b> ATGGCTCC
Mybbp1a	CAGAAATC <b>CACCT</b> GCCTCTGC	CAGAAATC <b>CGCTT</b> GCCTCTGC
Nhp2	ACCTGATC <b>CACCT</b> GCCCCTGC	ACCTGATC <b>CGCTT</b> GCCCCTGC
Pdgfa	CGCGGGCG <b>CGTGG</b> CAGCCGTC	CGCGGGCG <b>CGCGG</b> CAGCCGTC
Plat	TAATTGCC <b>CACGT</b> GTCCTGAG	TAATTGCC <b>CATGT</b> GTCCTGAG
Ramp2	CCGCCCCC <b>CACGT</b> GGCCGCCG	CCGCCCCC <b>CATGT</b> GGCCGCCG
Rpl10a	TTGAGGCC <b>AGGTG</b> GAGCCTGG	TTGAGGCC <b>AAGCG</b> GAGCCTGG
Rpl23	GTCCGGTC <b>ACGTG</b> GCTGAGTG	GTCCGGTC <b>ACATG</b> GCTGAGTG
Rps19	CGCTGGAC <b>AGGTG</b> GCAGCTGC	CGCTGGAC <b>AAGCG</b> GCAGCTGC
Rps7	TGGCAAGC <b>ACGTG</b> GTCTTCAT	TGGCAAGC <b>ATGCG</b> GTCTTCAT
Skp1a	TTTATGGC <b>ACGTG</b> GAGGAAAA	TTTATGGC <b>ATGCG</b> GAGGAAAA
Slc10a1	CTCAGGAC <b>ACGTG</b> GTCCTCAA	CTCAGGAC <b>ACATG</b> GTCCTCAA
Tfdpl	GTAAAGGC <b>CACCT</b> GACTGCGC	GTAAAGGC <b>CGCTT</b> GACTGCGC
Tmem97	AGAAGGAC <b>ACGTG</b> GGGTCCAT	AGAAGGAC <b>ACATG</b> GGGTCCAT
Vill	AGGAGCCC <b>CACCT</b> GTCTGTCC	AGGAGCCC <b>CATCT</b> GTCTGTCC

### 3.1.4.2 PCR-Primer

Die PCR-Primer wurden mit der Primer3web Version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) designt. Hierzu wurde die NCBI Referenz Sequenz (RefSeq) im FASTA Format als Grundlage genutzt. Für die optimale Primerlänge wurden 21 Nukleotide ausgewählt. Der Tm des Primers sollte optimal bei 60°C liegen und der Tm des Produktes bei maximal 90°C. Der GC-Gehalt der Primer sollte mindestens bei 45 % und maximal bei 65 % liegen. Das Produkt sollte zwischen 100 und 300 Nukleotide lang sein. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

Tabelle 3.1.4.2 A: Tabelle aller benutzten *mus musculus* (m) qRT-PCR-Primer

Primer	Sequenz	qRT-PCR Bedingungen*
Aqp4_fwd	GGGCTCCTGGTGGAGTTAATA	60, 7, 90/1, 82
Aqp4_rev	ATATCCAGTGGTTTGCCAGT	
Bcap29_fwd	GTCTGCCCTTTATCCTCCAC	55, 10, 120/1, 85
Bcap29_rev	GCTTCATCTGTGTGTGCTCAA	
Bola2_fwd	ACACGACTCTGAACCGTTGC	60, 7, 120/1, 87
Bola2_rev	GGGTCAGAGTTTTCTGCTCAA	
Bzw2_fwd	CAGGCACTGAAGCACCTAAAG	68, 9, 120/3, 85
Bzw2_rev	CACTTCAGTATCGCCTCTTCG	
C9_m_fwd	ATGGAGCAATTGGTCAGAGTG	65, 10, 120/1, 80
C9_m_rev	ATCTCCACAGTCGTTGTACC	

## Material und Methoden

Cfh_fwd	CAGGAGTACGAACGCTCAATC	65, 9, 120/1, 81
Cfh_rev	TAATGACTGCCACCTTCCATC	
Col5a2_fwd	TAACAGGTATACGCGGTCGTC	68, 10, 120/1, 84
Col5a2_rev	CAGCCATCTGAGCTGAAAAAG	
Dynl1_fwd	GAAGAGATGCAACAGGACTCG	60, 8, 90/1, 80
Dynl1_rev	CCACCTGACCCAGGTAGAAGT	
Gas6_fwd	CGATGAATGCACAGACTCAGA	68, 7, 120/2, 84
Gas6_rev	GTTGACACAGGTCTGCTCACA	
Ly6d_fwd	GCCCGTCCAACCTTCTACTTCT	65, 7, 120/1, 84
Ly6d_rev	CATAGGTCAGTCTGGCAGCAT	
Mmp12_fwd	CCAGAGGTCAAGATGGATGAA	68, 12, 120/3, 84
Mmp12_rev	TGGGCTAGTGTACCACCTTTG	
Mybbp1a_fwd	CTCCTTGTTGACTTCAGCAC	68, 7, 120/1, 86
Mybbp1a_rev	CACAGCTTCATCCTTCTCCAG	
Nhp2_fwd	ATTGCCGATTGAGGTGACTG	60, 7, 120/1, 85
Nhp2_rev	GCACTTGTCGTAGGTCTCCTG	
Nme1_fwd	ACTCAGGACCAGTGGTTGCTA	68, 8, 90/3, 82
Nme1_rev	TGAAACCACAAGCTGATCTCC	
Nol5a_fwd	CGCCAGAGCCTACACACTTAC	60, 9, 120/1, 80
Nol5a_rev	AGCCCCAAGGATCTGTACTGT	
Npm1_fwd	CCATCAACACCGAGATCAAAG	68, 8, 90/3, 85
Npm1_rev	ATTCCTCCACTGCCAGAGAT	
Pdgfa_fwd	CAAGACCAGGACGGTCATTTA	65, 8, 120/1, 86
Pdgfa_rev	ATACTCCACTTTGGCCACCTT	
Plat_fwd	AGAGTTACACAGCGTGGAGGA	68, 10, 120/2, 86
Plat_rev	AAGGGTGTGAGGTGATGTCTG	
Ramp2_fwd	GAACCAATCTCTCCGGAGTC	68, 7, 120/1, 85
Ramp2_rev	AGTTGCACCAGTCCTTGACAG	
Rexo2_fwd	GAGGTGTCAGCGAAGGTAGC	55, 8, 90/3, 81
Rexo2_rev	CTCCTTGCCAGTCTGACAT	
Rfc4_fwd	GGAGATTTACGGAAAGCCATC	68, 8, 120/1, 87
Rfc4_rev	AAAAGAGCCACTGTGACATGC	
Rpl10a_fwd	CTGCAGATCAGCCTGAAGAAC	60, 10, 120/1, 87
Rpl10a_rev	TCAGAGACTCAGAGGCCAAAA	
Rpl13a_fwd	CTGCTGCTCTCAAGGTTGTTC	55, 8, 90/3, 84
Rpl13a_rev	TTGGTCTTGAGGACCTCTGTG	
Rpl23_fwd	GGTGATGGCCACAGTTAAGAA	68, 7, 120/2, 79
Rpl23_rev	GCAGAGCCTTTCATCTCTCCT	
Rps19_fwd	GGTTGGTTCCATGACCAAGAT	60, 8, 120/0, 87
Rps19_rev	TCCTGTCCAGGTCTCTGTGC	
Rps7_fwd_1	GTGGGAAGCATGTCGTCTTT	65, 10, 120/3, 84
Rps7_rev_1	TGTTCTGCTGTGCTTTGTCC	
Rps7_fwd_2	AATCGAAGTTGGTGGTGGTC	60, 12, 120/0, 82
Rps7_rev_2	GCGCTTCTGCTTATTTTTCG	

## Material und Methoden

Skp1a_fwd	GGGACCAAGAATTCCTGAAAG	60, 9, 120/1, 82
Skp1a_rev	TTGGTTCTCTTTGCGTACCTG	
Slc10a1_fwd	CACCATGGAGTTCAGCAAGAT	65, 10, 120/1, 85
Slc10a1_rev	GGTCATCACAATGCTGAGGTT	
Stmn1_fwd	CCAGGCTTTTGAGCTGATTC	68, 9, 120/1, 85
Stmn1_rev	TTGTTCTCCTCGATGGCTTT	
Tfdp1_fwd	ACGTTTGAGATCCACGATGAC	60, 8, 120/1, 83
Tfdp1_rev	GAACCTGTTGTCGTGACGAAT	
Tmem97_fwd	GGTTCAAGTCCTTCCTGCTCT	68, 10, 120/2, 84
Tmem97_rev	CAGTCGTTACGGAAACTCTC	
Vil1_fwd	ACTCCCGGGATACAGATATGG	68, 7, 120/2, 82
Vil1_rev	AGTCCTGGCCAATCCAGTAGT	

\* Bedingungen setzen sich zusammen aus Primer Annealing [°C], Elongationszeit [s], Denaturierungszeit [s] bei 95°C als ersten Schritt und / am Ende jeden Zyklus sowie der Temperatur der Fluoreszenzmessung [°C].

Tabelle 3.1.4.2 B: Tabelle aller benutzten *homo sapiens* (h) qRT-PCR-Primer

Primer	Sequenz	qRT-PCR Bedingungen*
BOLA2_fwd	GCGTTGACGTACGCCTTAGT	68, 10, 90/3, 84
BOLA2_rev	ACTCGGAAGCTACAGGAGCA	
C9_hu_fwd	GCCAAAATGGAGGTACAGTGA	60, 7, 90/3, 82
C9_hu_rev	TCAGGGGTAGGATCTGAAGGT	
GAS6_fwd	ATGGACACCTGTGAGGACATC	68, 10, 120/1, 84
GAS6_rev	TCCGGAAGTCAAACCTCAGCTA	
MYBBP1A_fwd	GCATCCTGCAGCAGATACAA	60, 7, 90/3, 85
MYBBP1A_rev	CAGCTTCACCGACTTCATCA	
MYC_fwd	GAACCTACAACACCCGAGCAA	65, 10, 120/1, 83
MYC_rev	GCAGTAGAAATACGGCTGCAC	
NHP2_fwd	CACGCGGAAGCTCTACAAAT	65, 7, 90/3, 86
NHP2_rev	TACTCCTCATGGGGCTTGAC	
PDGFA_fwd	CAAGACCAGGACGGTCATTTA	65, 10, 120/1, 80
PDGFA_rev	TTCCTGACGTATTCCACCTTG	
RAMP2_fwd	GGGGGACGGTGAAGAACTAT	68, 10, 90/3, 83
RAMP2_rev	GTTGGCAAAGTGGATCTGGT	
RPL10A_fwd	TGGAGTTGCAGATCAGCTTG	68, 10, 90/3, 87
RPL10A_rev	GGCCAAAAACGCATCATACT	
RPS19_fwd	AGACGTGAACCAGCAGGAGT	65, 10, 120/1, 85
RPS19_rev	TTCTCTGACGTCCCCCATAG	
RPS7_fwd	GTGGGAAGCATGTCGTCTTT	65, 10, 90/3, 84
RPS7_rev	TGTTCTGCTGTGCTTTGTCC	
SKP1A_fwd	ACGCTGTAGTGGCTTCGTCT	68, 10, 90/3, 85

## Material und Methoden

SKP1A_rev	GGAAGTGGGTCATCATCTCC	
SLC10A1_fwd	ATCGTCCTCAAATCCAAACG	60, 9, 120/1, 87
SLC10A1_rev	CCATTGAGGCAGAAGAGAGC	
TFDP1_fwd	CGTCAACACCAGCAAGAAGA	65, 10, 90/3, 84
TFDP1_rev	CAACAGTTCCTGAGCCATT	
TMEM97_fwd	TTCTGTTTTGCGAGCTTGTG	60, 8, 90/3, 83
TMEM97_rev	GAAACCACTGGCTTTGGAGA	
VIL1_fwd	CAAGACAGGCTCACTACCA	60, 9, 90/3, 86
VIL1_rev	TGTCATAGGACAGGCTGCTG	

\* Bedingungen setzen sich zusammen aus Primer Annealing [°C], Elongationszeit [s], Denaturierungszeit [s] bei 95°C als ersten Schritt und / am Ende jeden Zyklus sowie der Temperatur der Fluoreszenzmessung [°C].

Tabelle 3.1.4.2 C: Tabelle aller benutzten Referenzgene qRT-PCR-Primer

Primer	Sequenz	qRT-PCR Bedingungen*
βActin_fwd (m)	GGCATTGTTACCAACTGGGACG	68, 17, 120/1, 88
βActin_rev (m)	CTCTTTGATGTCACGCACGATTC	
Gapdh_fwd (m, hu)	TGTTCTACCCCAATGTGT	68, 10, 120/1, 85
Gapdh_rev (m, hu)	ATGTAGGCCATGAGGTCCAC	
mtATPase6_fwd (m, hu)	CTAAAGGACGAACCTGA	55, 13, 120/1, 83
mtATPase6_rev (m, hu)	TGGCCTGCAGTAATGTT	

\* Bedingungen setzen sich zusammen aus Primer Annealing [°C], Elongationszeit [s], Denaturierungszeit [s] bei 95°C als ersten Schritt und / am Ende jeden Zyklus sowie der Temperatur der Fluoreszenzmessung [°C].

Tabelle 3.1.4.2 D: Tabelle aller benutzten Exon-Primer

Primer	Sequenz	qRT-PCR Bedingungen*
Ankfy1_FwdP	TAGCTTTGCAGCCAGACTCAT	50, 10, 90/1, 84
Ankfy1_FwdP2	GATCATTGTGCCTTGCCCTA	50, 7, 90/1, 84
Ankfy1_FwdP3	CTTTCATGAAGCTGGGTGTGT	50, 8, 90/1, 84
Ankfy1_FwdP4	CTTTCATGAAGCTGGGTGTGT	50, 7, 90/1, 84
Ankfy1_RevP	GAGTTTCTCCCCATTTGTTCC	50, 10, 90/1, 84
Ankfy1_RevP2	AAAGCCTGAGCCACATCTACA	50, 7, 90/1, 84
Ankfy1_RevP3	CTAAGCATTTGGCAGTTCAGC	50, 8, 90/1, 84
Arnt2_E1_F1_M	ACCACCTGCCTTTGAACAGA	60, 9, 90/3, 82
Arnt2_E1_F2_M	CCTTGCCCTGTGAAAGAAG	60, 10, 90/3, 82
Arnt2_E1_R1_M	GGCAATATTTACTGCCTTGTC	60, 9, 90/3, 82
Arnt2_E2_F1_M	GTGGAAAAGGCAGATGCAAT	60, 9, 90/3, 82
Arnt2_E2_F2_M	GAGCTCAGCCTCAGCATCA	60, 10, 90/3, 82
Arnt2_E2_R1_M	CTGCCGAGAGATCTGGGATA	60, 9, 90/3, 82
Arnt2_E3_F1_M	TTGGATCAAGCCACCCTTAC	60, 7, 90/3, 82
Arnt2_E3_F2_M	ACAGAGTGGCGGGCAGTT	60, 12, 90/3, 82

## Material und Methoden

Arnt2_E3_R1_M	TGGCTTTGCCTGAAGCTACT	60, 7, 90/3, 82
Arnt2_E3_R2_M	CTGCTGATGCGAGTGCTG	60, 12, 90/3, 82
Aukb_fwdP	CAGAACAAGCAGCCTTTCACT	55, 8, 90/3, 79
Aukb_revP	CCACATCCATGCCTAGTGTCT	55, 8, 90/3, 79
Btbd1_fwdP	GGGACTGCTAACACATTCAGG	65, 7, 90/1, 82
Btbd1_revP	GGAAAACAGTCTTGCTTGCCAG	65, 7, 90/1, 82
Btbd1_revP2	GCTTAGTGGGATGGGAGTGAT	65, 7, 90/1, 82
Cad_fwdP	GTGTTGCTTGGTTCAGTG	60,10, 90/3, 87
Cad_revP	TTGTAGGAAGGGTCAGTGAGG	60, 10, 90/3, 87
Chmp1a_E1_F1_M	GAGACAGCGGGTCCGTAAC	55, 8, 90/3, 85
Chmp1a_E1_F2_M	ACCCTGTTCCAGTTGAAG	55, 8, 90/3, 85
Chmp1a_E1_R1_M	CTTCTTCACTTTGGCCTGCT	55, 8, 90/3, 85
Dock7_fwdP	GCTCTGCAGCCACTGATAAAC	65, 10, 120/1, 87
Dock7_revP	CTGGGAGCACATTCTTCAGAG	65, 10, 120/1, 87
Eef1a1_E1_F1_M	GGTATATAAGTGCAGCAGTCG	50, 11, 90/1, 80
Eef1a1_E2_R1_M	ACTTTTCGATGGTTCGCTTG	50, 11, 90/1, 80
Eef1a1_E3_F1_M	GCGTGAGCGTGGTATCACTA	50, 9, 90/1, 80
Eef1a1_E4_R1_M	ACACCAGCAGCAACAATCAG	50, 9, 90/1, 80
Eef1a1_E5_F1_M	TTGGTTCAAGGGATGGAAAG	50, 7, 90/1, 80
Eef1a1_E6_R1_M	AGCAAAGGTAACCACCATGC	50, 7, 90/1, 80
Gata4_fwdP	TTTGTCTGGGAACAACCTCTG	55, 5, 90/1, 84
Gata4_fwdP2	TTTTCTGGGAAACTGGAGCTG	55, 12, 90/1, 84
Gata4_revP	TGTGCCCATAGTGAGATGACA	55, 5, 90/1, 84
Gata4_revP2	CACCGGCTAAAGAAGCCTAGT	55, 12, 90/1, 84
Gata4_revP3	GACAGAGCCACTGCTGTTACC	55, 12, 90/1, 84
Itr2_fwd	TTCTTTACCACGTGGCCTATG	55, 7, 90/1, 82
Itr2_fwdP	TAGCCCGGAACCTCATCTATT	55, 10, 90/1, 82
Itr2_rev	CCATGGTGAAGTCGCTCTTA	55, 7, 90/1, 82
Itr2_revP	GGTCTCATGACATTGTTGCT	55, 10, 90/1, 82
Mybbp1a_m_E_1_Fwd1	TGAAAGTGATCCTCCGCTCT	55, 12, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_1_Fwd2	TCTGGTGAACATCCTGAAGGT	55, 7, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_1_Rev1	CAACTGCAACTGCTCCTCTG	55, 12, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_1_Rev2	GATGTCCAGGACGGATTCTT	55, 7, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_2_Fwd1	TGCAGAAAGCTGTGATGTCC	55, 8, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_2_Fwd2	GGAGATCTTGCTGTCCTTGC	55, 7, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_2_Rev1	TGCTTCTCATCAGCGTCATC	55, 8, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_2_Rev2	GCTGCAGACAACGTGGAGTA	55, 7, 90/3, 86
Mybbp1a_m_E_3_Fwd1	AAGAACCTGCTTCCCCTCT	55, 7, 90/3, 88
Mybbp1a_m_E_3_Fwd2	GCCTGATGCTCCAGAAGACT	55, 5, 90/3, 88
Mybbp1a_m_E_3_Rev1	CGTGATTGACTGCTCCTCAACA	55, 7, 90/3, 88
Mybbp1a_m_E_3_Rev2	GTGGCCTTTCCCAAGAGTTG	55, 5, 90/3, 88
St6gal1_E1_F1_M	CTTCCCGATTGAGAGAGCTG	60, 6, 120/1, 87
St6gal1_E2_F1_M	CCCGGAAGTCAACTGAAATG	60,8, 120/1, 87
St6gal1_E3_R1_M	TGTTCTCCATGGGAAAGAGG	60, 6, 120/1, 87

## Material und Methoden

St6gal1_E4_R1_M	AGCAGCCTGGGGTTAAGTTT	60,8, 120/1, 87
Stat1_fwdP	CGGTACTTTTCGGTTTTTCAGC	60, 9, 120/3, 85
Stat1_revP	CTGAAACGACTGGCTCTCACT	60, 9, 120/3, 85
Tfdp1_m_E_1_Fwd1	TTCGGACAGTCCAATGTCAA	55, 6, 90/1, 84
Tfdp1_m_E_1_Fwd2	CTCAGAGACCGGCAGCAT	55, 8, 90/1, 84
Tfdp1_m_E_1_Rev1	TCGTCAGCCACCTCATTGTA	55, 6, 90/1, 84
Tfdp1_m_E_1_Rev2	GCAGACCAAGGTGAGGAGTC	55, 8, 90/1, 84
Txlna_E1_F1_M	AGATGCTGAAGGAGGCAGAG	55, 10, 90/3, 86
Txlna_E1_R1_M	TCCTGTTTGAACGTGGTGAA	55, 7, 90/3, 86
Txlna_E1_R2_M	TGCTTTAGGTGGGTCTCCTG	55, 10, 90/3, 86
Ugt1a6a_fwdP	GGAAACCGACTTCCAGATTC	55, 8, 120/1, 83
Ugt1a6a_fwdP2	AGTTCCCCAGACCTGTGATG	55, 9, 120/1, 83
Ugt1a6a_revP	CTCCTTCATGCTAAGCCAGTG	55, 8, 120/1, 83

\* Bedingungen setzen sich zusammen aus Primer Annealing [°C], Elongationszeit [s], Denaturierungszeit [s] bei 95°C als ersten Schritt und / am Ende jeden Zyklus sowie der Temperatur der Fluoreszenzmessung [°C].

Tabelle 3.1.4.2 E: Tabelle der PCR-Primer zur Überprüfung der transgenen Tiere

Primer	Sequenz	PCR-Programm
$\alpha$ 1AT-Myc-fwd	CACTGCGAGGGTTCTGGAGAGGC	15 min 95 °C, 1 min 60 °C, 1 min 70 °C, 1 min 95 °C, 31 Zyklen
$\alpha$ 1AT-Myc-rev	ATCGTCGTGGCTGTCTGCTGG	

### 3.1.5 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Mäuse des Stammes C57/Blex6 verwendet. Die Tiere waren im Alter zwischen 2 und 12 Monaten. Die durchgeführten Tierversuche hielten sich strikt an die Regularien des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006. Ein  $\alpha$ 1AT-Myc-Gen-Konstrukt wurde zur Generierung der transgenen Tiere verwendet. Dieses setzte sich zusammen aus einem humanen  $\alpha$ 1AT-Promoter und dem murinen c-Myc Gen. Die Transgenität der Tiere wurde mittels PCR festgestellt.

Tabelle 3.1.5: Versuchstiere

Anzahl der Versuchstiere	Alter	Probe
6	12 Monate	Lebertumor
4	12 Monate	nicht-transgene Leber
1	11 Monate	Lebertumor
9	7 Monate	transgene Leber

## Material und Methoden

8	7 Monate	nicht-transgene Leber
4	6 Monate	transgene Leber
3	6 Monate	nicht-transgene Leber
4	2 Monate	transgene Leber
3	2 Monate	nicht-transgene Leber

### 3.1.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.1.6: Liste der Verbrauchsmaterialien

0,2, 0,5 und 1,5 ml-Reaktionsgefäße; PCR DNase, RNase-frei	Eppendorf
Polysorb 96-well-ELISA-Platte	Nunc
1,2 ml Kryoröhrchen	Sarstedt
1,5 und 2 ml-Reaktionsgefäße, steril	Eppendorf
15 bzw. 50 ml-Röhrchen, konisch, steril	Sarstedt
3MM Filterpapier	Whatman
45 µm-Spritzensterilfilter	Satorius
96, 12 oder 6-Well-Zellkulturplatten	Biochrom
AdhesiveCap 500 opaque	PALM/Zeiss
Einmalhandschuhe; Latex und Nitril	MaiMED
GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array®	Affimetrix
GeneChip Murine Genome U74Av2 Array®	Affimetrix
Glaspipetten, 5, 10 und 25 ml	VWR
Light Cycler TM Capillaries	Roche
MembraneSlide 1.0 PET	PALM/Zeiss
Microspin G-25 Column	Sigma Aldrich
Pasteurpipetten	VWR
PCR 8er Stripes Reaktionsgefäße mit Deckel DNase, RNase-frei	ABgene
Phosphor-Storage-Screen K	BioRad
Pipettenspitzen, passend für Eppendorf Research Pipetten	VWR
PVDF-Hybridization-Transfer-Membran	Perkin
serologische Pipetten, 5, 10 und 25 ml	Sarstedt
Sterilfilter, Flaschenaufsatzfilter 0,2 µM Porengröße	Sarstedt
Super Frost Objektträger	Menzel
Wägeschälchen	VWR
Zellkulturflaschen: je nach Bedarf 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	TPP
Zellschaber	TPP

## Material und Methoden

### 3.1.7 Geräte

Tabelle 3.1.7: Liste der verwendeten Geräte

48er Metallständer	VWR
ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Absaugpumpe	IKA
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent
Analysenwaage Secura®	Satorius
Chip Priming Station	Agilent
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Sanyo
Counter LS 6500	Beckman Coulter
Dichtungsbarrieren	Serva
Einfrierbox für Zellen	neoLab
Elektrophoresekammer	Serva
Elektrophoresekammer	BioRad
Eppendorf Research Pipetten 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Eppendorf
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Fluidics Station 450	Affimetrix
Gelträger 15x20 cm	Serva
GeneChip® Scanner 3000 7G	Affimetrix
Hybridization Oven 640	Affimetrix
Kämme mit 10 Taschen	Serva
Kämme mit 20 Taschen, 1,5 mm	Serva
Kapillaren Releaser	Roche
Kodak Image Station 440CF	Kodak
Kryomikrotom CM1860 Kryostat	Leica®
Kühlbox mit 32 Adaptern für Kapillaren	Roche
Light Cycler Carousel Centrifuge	Roche
Light Cycler TM System	Roche
Magnetrührer	Heidolph
Mikrofuge 22R Kühlzentrifuge für Eppendorfgefäße	Hettich
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikrowelle	Bosch
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	BioRad
Molecular Imager FX	BioRad
Multifuge 1SR Kühlzentrifuge für 15 bzw. 50 ml-Zentrifugenröhrchen	Heraeus
NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik
PALM MicroBeam Apparatur	PALM/Zeiss
Pipetboy	IBS

## Material und Methoden

Plastikbehälter in Blotgröße	VWR
Power Pack	BioRad
Reaktionsgefäßständer für 0,5, 1,5 und 2 ml-Caps	VWR
Reaktionsgefäßständer für 15 und 50 ml-Röhrchen	VWR
SFX150 Sonifier®	Branson
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Mahl
Thermocycler	Biometra T3 Thermocycler
Thermocycler	Biometra UNOII
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Sigma Aldrich
Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	BioRad
Ultraschallprozessor UP 2005	Dr. Hielscher
Ultrazentrifuge Optima™ XPN-90	Beckman Coulter
Ultrazentrifugen Rotor SW32 und SW28.1	Beckman Coulter
Ultrazentrifugen Tubs SW32 und SW28.1	Beckman Coulter
Victor 3 Wallac 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer
Vortexer, diverse Ausführungen	IKA
Waage basic Plus 3100P	Satorius
Wasserbad Sw 23	Julabo
Wippschüttler	VWR

### 3.1.8 Verwendete Software und Onlineprogramme

Tabelle 3.1.8: Liste der verwendeten Software und Onlineprogramme

ArrayTrack™ Software	National Center for Toxicological Research (NCTR/FDA); <a href="http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/Arraytrack/">http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/Arraytrack/</a>
AxioVision Software	PALM/Zeiss; <a href="http://www.zeiss.de/microscopy/de_de/downloads/axiovision.html#axiovision-le">http://www.zeiss.de/microscopy/de_de/downloads/axiovision.html#axiovision-le</a>
BioMart data mining tool	Ensembl Project; <a href="http://www.ensembl.org/biomart/martview">http://www.ensembl.org/biomart/martview</a>
BLASTN-Analyse	National Center for Biotechnology Information; <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov</a>
BLAT-Analyse	UCSC Genome Bioinformatics; <a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start</a>
Gene Set Annotation	Ensembl Project; <a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
GeneChip® Operating Software (GCOS, Version 1.1)	Affimetrix; <a href="http://www.affymetrix.com">http://www.affymetrix.com</a>

## Material und Methoden

HMMgene (v.1.1) Analyseprogramm	Center for Biological Sequence Analysis; <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/HMMgene/">http://www.cbs.dtu.dk/services/HMMgene/</a>
Ingenuity Pathways Analysis	Ingenuity Systems Inc.; <a href="http://www.Ingenuity.com">http://www.Ingenuity.com</a>
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	KEGG; <a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
MATCH™ Tool	BIOBASE; <a href="http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match.">http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match.</a>
Microarray Suite 5.0	Affimetrix; <a href="http://www.affymetrix.com">http://www.affymetrix.com</a>
PANTER™ Classificatio n System Version 10	GENEONTOLOGY Unifying Biology; <a href="http://www.pantherdb.org">http://www.pantherdb.org</a>
RefSeq NCBI Reference Sequence Database	National Center for Biotechnology Information; <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
SeqScape 2.0	Applied Biosystems; <a href="http://home.appliedbiosystems.com/about/contact/">http://home.appliedbiosystems.com/about/contact/</a>
TRANSFAC® Tool Release 9.4	BIOBASE; <a href="http://www.biobase-international.com/">http://www.biobase-international.com/</a>
Xray Excel® Array Analysis	Biotique Systems; <a href="http://www.biotiquesystems.com/">http://www.biotiquesystems.com/</a>

### 3.1.9 Zelllinie

Tabelle 3.1.9: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Zellart	Nummer	Lieferant
HepG2	humanes hepatozelluläres Karzinom	HB-8065	ATCC

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### Auftauen von Zellen zur Kultivierung

Das Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff sollte zügig passieren, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO die Zellen schädigt. Die Zellen wurden dem Gefrierbehältnis entnommen und der Deckel des Röhrchens unter der Sterilbank eine halbe Gewindedrehung aufgedreht, um ein Entweichen des Stickstoffs zu ermöglichen. Die Zellsuspension wurde im Wasserbad unter Bewegung aufgetaut und unter der Sterilbank in ein 15 ml-Röhrchen mit 8 ml gekühltem Medium überführt. Das Röhrchen wurde bei 900 U/min, 4°C, 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit Medium aus der vorbereiteten Zellkulturflasche sorgfältig resuspendiert. Dann wurden die Zellen in die

## Material und Methoden

vorbereitete Zellkulturflasche (T25-Zellkulturflasche mit 5 ml Medium) gegeben und im Inkubator kultiviert.

### Kultivierung

Die HepG2-Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, in Zellkulturgefäßen bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1x L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100x; 24ml/l) kultiviert. Der Medienwechsel wurde alle 2-3 Tage unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Pro T25-Zellkulturflasche werden 5 ml, pro T75-Zellkulturflasche 10-20 ml und bei 6-well-Platten 1-2 ml Medium je Well vorgewärmtes Medium zugegeben. Die Zellen wurden alle 4-7 Tage in einem Verdünnungsverhältnis von 1:5-1:10 passagiert. Hierzu wurden die Zellen 2x mit PBS- gewaschen. Pro zu passagierender T25-Flasche wurden 3 ml 1x Trypsin auftaut (für T75-Flasche 4 ml 1x Trypsin), auf die Zellen gegeben und für 4 min bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis die Zellen sich ablösten. Zum Abstoppen des Trypsins wurden 8 ml kaltes Medium zu der T25-Flasche gegeben (10 ml für T75-Flasche). Die abgelösten Zellen wurden zusammen mit dem Medium in ein 15 ml-Röhrchen überführt und für 5 min bei 900 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit warmem Medium resuspendiert. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 20 µl der Zellsuspension zu 180 µl Trypanblaufärbelösung gegeben und mit der Pipette sorgfältig gemischt. 20 µl dieser Lösung wurden auf die Neubauerzählkammer gegeben. Es wurden 2x vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert hieraus bestimmt. Durch Multiplikation mit 100.000 ergab sich die Zellzahl pro ml. Durch weitere Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (= ml des zugegebenen kalten Mediums) ergab sich die Gesamtzellzahl.

Beispiel:

$$\begin{array}{rcl} \text{Mittelwert der Zellzählung} & \times 100.000 & \times 8 \text{ ml (bei T25-Flasche)} \\ 20 & \times 100.000 & \times 8 \text{ ml} = 1,6 \times 10^7 \text{ Zellen/ml} \end{array}$$

### Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden nicht konfluente Zellkulturflaschen möglichst an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eingefroren (pro T25-Flasche erhielt man 1-2 Kryoröhrchen). Das verwendete Einfriermedium bestand aus 70 ml DMEM high Glucose, welches mit 25 ml FCS, 5 ml DMSO und 1,1 ml Penicillin/Streptomycin (100x) versetzt

## Material und Methoden

wurde. Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, abtrypsinisiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 900 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit entsprechendem Volumen (je nach Zellmenge ca. 1- 6 ml) Einfriermedium resuspendiert. Die Kryoröhrchen mit Außengewinde wurden exakt mit 0,8 ml Zellsuspension befüllt und die Zellen langsam in einer Einfrierbox für Zellen bei -80 °C eingefroren. Nach mindestens 24 h konnten die Zellen in den Stickstofftank (-196 °C) überführt werden.

### Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurden die HepG2-Zellen in T25-Flaschen und T75-Flaschen in einer Zelldichte von  $1,2 \times 10^6$  und  $3,6 \times 10^6$  Zellen ausgesät und für 24 h unter den zuvor beschriebenen Bedingungen gehalten. Nach 24 h wurde das Medium durch ein Mangelmedium (0,1 % FCS statt 10 % FCS) ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Im Anschluss wurde das Mangelmedium durch das Behandlungsmedium (DMEM mit 40 oder 80 ng/ml rhHGF, ohne FCS) ersetzt. Die Kontrollzellen erhielten wieder das Kulturmedium. Die Zellen wurden für 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 14 h, 24 h und 48 h behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und für die anschließenden Versuche gesammelt. Hierzu wurden sie in 1,5 ml-Eppendorf-Cups überführt und mit PBS- gewaschen. Das Zellpellet wurde bei -80 °C bis zur Aufarbeitung zum Proteinextrakt gelagert. Für eine anschließende RNA-Isolation wurden die Zellpellets mit RLT-Puffer versetzt.

#### Kulturmedium:

500 ml DMEM high Glucose  
+ 50 ml FCS  
+ 5 ml L-Glutamin (100x)  
+ 12 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

#### Behandlungsmedium:

500 ml DMEM high Glucose  
+ 40 oder 80 ng/ml rhHGF  
+ 5 ml L-Glutamin (100x)  
+ 12 ml Penicillin/Streptomycin (100x)

### Bestimmung des Zellzyklus

Die Zellzyklusanalyse wurde mit dem FACS (Becton Dickinson) und dem Cycle Test<sup>TM</sup> Plus Kit (BD Bioscience, NJ USA) durchgeführt. Das Kit beinhaltete drei Lösungen, die erste Lösung A enthielt Trypsin in einem Spermin-Tetrahydrochlorid-Puffer. Die Lösung B bestand aus RNase A und einem Trypsin-Inhibitor in Spermin-Puffer. Die Lösung C beinhaltete

## Material und Methoden

Propidiumiodid in einem Spermin-Puffer mit DMSO (Dimethylsulfoxide) und Saccharose-Natriumcitrat. Bei dieser Methode wurden die Zellmembranlipide mit Trypsin (Lösung A) aufgelöst sowie das Zytoskelett und die Kernproteine zerstört. Die zelluläre RNA wurde mit RNase A (Lösung B) abgebaut, während das Chromatin mit Spermin stabilisiert wurde [Vindelov LL et al., 1983]. Das Propidiumiodid der Lösung C interkalierte stöchiometrisch in die DNA aller Zellzyklusphasen, weshalb die Fluoreszenzintensität direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle war. Im FACS wurde die Zellzahl (Counts) gegen die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen, dieses Histogramm stellte folglich die Zellzyklusverteilung der Zellpopulation dar [Humason, GL, 1979; Martens, et al., 1981; Hiddemann W et al., 1984]. Neben der Zellzyklusverteilung in einer Zellpopulation ist es grundsätzlich möglich, durch die DNA-Fragmentierung, die ein Merkmal apoptotischer Zellen ist, diese zu quantifizieren. Der Hauptanteil der Zellpopulation befindet sich im unten aufgeführten Beispiel in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase (DNA-Gehalt: 2n). Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase fluoreszierten doppelt so stark (DNA-Gehalt: 4n), während Zellen der S-Phase mit ihrem DNA-Gehalt zwischen diesen Phasen liegen, da sie neue DNA synthetisierten (DNA-Gehalt: 2n - 4n). Da apoptotische Zellen fragmentierte DNA beinhalten, die aus dem Kern diffundierten, enthalten diese Zellen einen verminderten DNA-Gehalt (DNA-Gehalt: <2n) und erscheinen mit verminderter Fluoreszenz im subG<sub>1</sub>-Bereich (hypoploid).

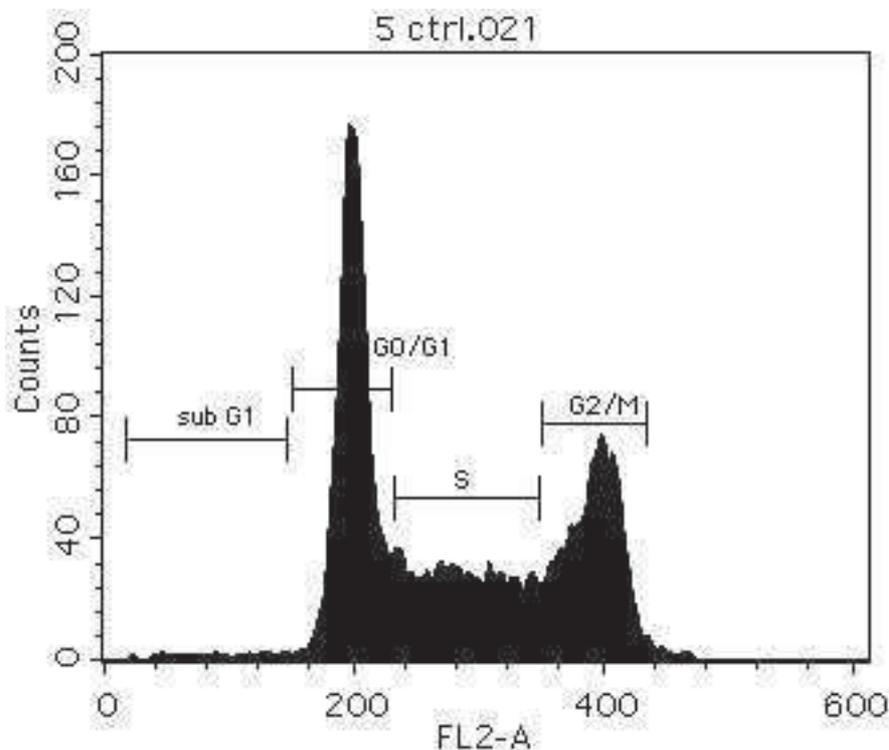


Abb. 3.2.1: Zellzyklusverteilung im FL2-A-Histogramm

## Material und Methoden

Das Fluoreszenzsignal im FL2-Kanal ermöglicht die Darstellung der Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation. Zellen mit einfachem DNA-Gehalt ( $2n$ ) der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase sammeln sich im Bereich von 200, Zellen der G<sub>2</sub>/M-Phase mit doppeltem DNA-Gehalt ( $4n$ ) bei 400, und S-Phase-Zellen erscheinen im Bereich dazwischen. Apoptotische hypodiploide Zellen erscheinen im „subG<sub>1</sub>“-Bereich.

### 3.2.2 Histologie

#### Einbettung von Gewebe für Kryoschnitte

Das Lebergewebe von sechs bzw. sieben Monate alten Tieren wurde nach erfolgter Sektion mit PBS- gewaschen, zerteilt, in Jung Einbettmedium (Leica Instruments GmbH, Nussloch) eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Bis zum Schneiden mit dem Kryomikrotom wurden die eingebetteten Leberproben bei -80 °C gelagert. Für die histologische Analyse der Präparate wurden 5 - 6 µm-Schnitte, für die Mikrodissektion mit dem PALM MicroBeam 10 µm-Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Menzel, Super Frost) überführt. Für die Mikrodissektion wurden PET-Membran-bespannte Objektträger verwendet und das gelaserte Material in AdhesiveCap 500 opaque durch die PALM MicroBeam Apparatur transferiert.

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Kryoschnitte für Histologie

Zur schnellen histologischen Betrachtung der Schnitte wurden die 5 - 6 µm dicken Schnitte in Hämatoxylin (Gill II) für 30 s gefärbt (Zellkernfärbung) und im Anschluss unter Leitungswasser (pH 6,8 – 7,0) gebläut. Die Gegenfärbung wurde mit Eosin B-Lösung (0,5 % wässrig) für 15 s durchgeführt. Hierbei wurden die kationischen/eosinophilen Strukturen (z. B. Proteine) angefärbt. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydrierung wurden die Präparate schließlich in Xylol geklärt und mit einem Eindeckmittel (Immu Mount, Fisher Scientific) und einem Deckglas bedeckt.

#### Hämatoxylin-Färbung der Kryoschnitte für PALM MicroBeam

Die 10 µm dicken Kryoschnitte wurden in Methanol/Essigsäure (3 % Eisessig in Methanol) für 30 s fixiert, anschließend 1x für 30 s in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Hämatoxylin (Gill II) für 30 s gefärbt (Zellkernfärbung) und im Anschluss 2x in DEPC-H<sub>2</sub>O für 30 s gewaschen und gebläut. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 80 % Ethanol, 2x 100 %

## Material und Methoden

Ethanol absolut) zur Dehydrierung wurden die Präparate getrocknet und am PALM MicroBeam für die Mikrodissektion weiterverwendet. Bei der Mikrodissektion wurden bestimmte morphologische Regionen des Präparates ausgewählt und mittels der System-Software AxioVision über Laser Mikrodissektion & Pressure Catapulting (LMPC) mit dem Transport durch Laserlicht in AdhesiveCap 500 opaque kontaminationsfrei transferiert und gesammelt (es wurden  $10^7 \mu\text{m}^2$  pro Cap gesammelt). Im Anschluss wurde eine RNA-Isolierung aus dem Gewebe mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.3 RNA-Analyse

#### Isolierung von gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung von gesamtzellulärer RNA wurde mittels RNeasy Micro Kit und RNeasy Mini Kit nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das RNeasy Micro Kit wurde für die Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Mikrodissektionsproben benutzt. Eluiert wurde die RNA mit 14  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser. Das RNeasy Mini Kit wurde zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus HepG2-Zellen und Lebergewebe eingesetzt. Hierzu wurde das Zellpellet von zwei T25-Flaschen bzw. 30-40 mg Lebergewebe verwendet. Der Aufschluss der HepG2-Zellen erfolgte durch Sonifizierung mit dem Ultraschallstab dreimal bei Cycle 1 und Amplitude 100 % in RLT- $\beta$ -Mercaptoethanol-Puffer. Das Gewebematerial wurde im RLT- $\beta$ -Mercaptoethanol-Puffer für ca. 20 - 40 s mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Eluiert wurde die RNA in 30  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser.

#### Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von RNA mittels NanoDrop

Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wurden mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt. Hierzu wurde 1  $\mu\text{l}$  der isolierten RNA luftblasenfrei auf die Messelektrode gegeben und die Messung durchgeführt. Durch die Methode „Nucleid Acid Measurement“ des ND-1000-Systems bestand die Möglichkeit der Beurteilung der Messung über den Kurvenverlauf und die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses von 260 nm zu 280 nm. Bei reiner RNA sollte der Quotient  $260/280 \geq 2,0$  sein, kleinere Werte würden auf Verunreinigungen durch Proteine oder DNA hindeuten.

#### Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von RNA mittels Agilent 2100 Bioanalyzer

Die Qualität und Quantität der isolierten RNA, die im späteren Verlauf für die Exon Arrays weiterverwendet wurde, wurden zuvor zusätzlich mittels Agilent 2100 Bioanalyzer

## Material und Methoden

kontrolliert. Hierzu wurde das RNA 6000 Pico Kit nach Herstellerangaben befolgt und der RIN- (RNA integrity Number) Wert bestimmt. Für die weitere Aufarbeitung für die Exon Arrays wurden lediglich RNA-Proben mit einem RIN von über vier verwendet.

### 3.2.4 DNA-Analyse

#### Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA wurde nach dem Standardprotokoll für Omniscript Reverse Transkription (Qiagen) durchgeführt. Hierzu wurden 50 ng-2 µg der zuvor isolierten RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12,75 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C im Thermomixer denaturiert. Währenddessen wurde folgender Reaktionsmix vorbereitet:

	<b>1xRT</b>
10x RT-Puffer	2 µl
dNTP's 5 mM	2 µl
Random Hexameres 5 µM	2 µl
RNasin 5 µM	0,25 µl
RTase	1 µl
<b>gesamt</b>	<b>7,25 µl</b>
Endvolumen (RT-Mix + Probe)	20 µl

Nach dem Denaturieren wurden die RNA-Proben auf Eis 2 min heruntergekühlt, dann abzentrifugiert und der Reaktionsmix hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde gevortext und abzentrifugiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert, wobei die Reverse Transkriptase die RNA zu cDNA umschrieb. Durch anschließendes 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C wurden die Enzyme denaturiert, danach abgekühlt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für eine anschließende PCR wurde die cDNA 1:4 verdünnt.

#### RT-PCR im Biometra T3 Thermocycler

Für die RT-PCR wurden 25-50 ng cDNA pro Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl pro Reaktionsansatz und setzte sich aus 5 µl cDNA und 15 µl des unten aufgeführten Mastermixes zusammen.

Mastermix:

Komponente	Volumen	Endkonzentration der Komponenten
10x PCR-Puffer	2,0 µl	1,0x
Abgene Thermo-Start Taq	0,125 µl	0,625 U

## Material und Methoden

10 mM dNTP's	0,5 µl	250 µM
bidest Wasser	10,375 µl	-
10 µM Primer-Gebrauchslösung	2,0 µl	1 µM

Die oben angegebenen Komponenten wurden zusammen pipettiert, gevortext und kurz anzenrifugiert. Die PCR-Ansätze wurden in den Biometra T3 Thermocycler gestellt und die PCR gestartet. Die PCR-Bedingungen für das Annealing (Annealing Temperatur X °C) richteten sich nach den benutzten Primer Paaren und können der Tabelle 2.1.4.2 entnommen werden.

PCR-Programm:

95 °C 15 min

94 °C	30 s	} 35 Zyklen
Annealing Temperatur X °C	45 s	
72 °C	45 s	

74 °C 10 min

4 °C Pause

Durch 15-minütiges Erhitzen auf 95 °C wurde die Thermo-Start Taq Polymerase hitzeaktiviert. Nach Beendigung des PCR-Programms wurden die PCR-Reaktionen bei -20 °C gelagert, bis die Proben in einer Agarose-Gelelektrophorese (AGE) aufgetrennt oder für weitere Analysen eingesetzt wurden.

### qRT-PCR mit dem Light Cycler™ System

Die nachfolgend beschriebene qRT-PCR verwendete den Farbstoff SYBR GreenI, welcher in die DNA interkalierte. Durch diese Bindung wurde die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt, so dass man ein Signal erhielt, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge war. Im Light Cycler™ System wurde diese emittierte Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen und somit in Echtzeit die Produktzunahme des Amplifikats verfolgt und aufgezeichnet. Bei der anschließenden Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt. Bei einer für das Amplifikat spezifischen Temperatur brach die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge auf und der

## Material und Methoden

Fluoreszenzfarbstoff löste sich ab. Die damit einhergehende Fluoreszenzabnahme wurde aufgezeichnet.

Die Darstellung der Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzsignals ergab einen Kurvenverlauf, der das spezifische PCR-Produkt (Primer-abhängig) von unspezifischen Produkten wie Primer-Dimeren unterscheidbar machte.

Bei der Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „*Housekeeping Gen*“ (Referenzgen) bezogen. Die hier angewendete Effizienz-korrigierte Quantifizierung ist eine Quantifizierung, bei der man die unterschiedlichen real-time PCR Effizienzen der untersuchten Faktoren mitberücksichtigt [Pfaffl, M.W. 2001]. Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens im Nenner zusammen. Die hiermit berechnete Ratio ist nur von den Expressionsunterschieden des Zielgens abhängig. Als Referenzgen für die Untersuchungen mit dem Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*). Für Untersuchungen ohne den Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix wurde  $\beta$ -Actin verwendet, sowie mtATPase für alle humanen qRT-PCR Analysen.

Bei dieser qRT-PCR wurden 50 ng cDNA (25 ng/ $\mu$ l) eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 20  $\mu$ l pro Reaktionsansatz und setzte sich aus 2  $\mu$ l cDNA und 18  $\mu$ l des unten aufgeführten Mastermixes zusammen.

Mastermix:

Komponente	Volumen	Endkonzentration der Komponenten
Nuklease-freies Wasser	4,8 $\mu$ l	-
10x PCR-Puffer	2,0 $\mu$ l	1,0x
3,3 mg/ml BSA	4,0 $\mu$ l	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3,0 $\mu$ l	
10 mM dNTP's	1,0 $\mu$ l	250 $\mu$ M
10 $\mu$ M Primer-Gebrauchslösung	2,0 $\mu$ l	1 $\mu$ M
SYBR Green I Gebrauchslsg.	1,0 $\mu$ l	
Taq Polymerase	0,2 $\mu$ l	0,625 U

oder

Mastermix mit dem Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix:

## Material und Methoden

Komponente	Volumen	Endkonzentration der Komponenten
Nuklease-freies Wasser	7,0 µl	
10 µM Primer Gebrauchslösung	1,0 µl	0,5 µM
ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix	10,0 µl	

Der Mastermix wurde durch Invertieren gemischt und abzentrifugiert. Es wurden jeweils 18 µl des Mixes in die Glaskapillaren verteilt, dann 2 µl der entsprechenden Probe hinzu pipettiert und mit dem Deckel verschlossen. Die Kapillaren wurden danach in das Probenkarussell gesteckt. Die Proben und der Mastermix wurden mit Hilfe der LC Carousel Centrifuge in die Kapillaren zentrifugiert und anschließend in den Light Cycler gestellt. Die Probenreihenfolge wurde im Programm dokumentiert und das PCR-Programm gestartet.

Hierfür wurden folgende Programme verwendet:

Für die PCR **ohne** ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix:

Denaturierungsprogramm	Target Temperatur °C	Inkubationszeit s	Temperatur Transition Rate °C/s
Aktivierung der Polymerase und Denaturierung	95	siehe Tabelle 3.1.4.2	20.00
PCR-Programm	45 Zyklen		
Denaturierung	95	siehe Tabelle 3.1.4.2	20.00
Primer Annealing	siehe Tabelle 3.1.4.2	8	20.00
Elongation	72	siehe Tabelle 3.1.4.2	20.00
Schmelzprogramm	95	0	20.00
	60	0	20.00
	98	0	0.2
Kühlprogramm	40	10	20.00

Für die PCR **mit** ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix:

Denaturierungsprogramm	Target	Inkubationszeit	Temperatur Transition
------------------------	--------	-----------------	-----------------------

## Material und Methoden

	Temperatur °C	s	Rate °C/s
Aktivierung der Polymerase und Denaturierung	95	900	20.00
PCR-Programm	45 Zyklen		
Denaturierung	95	15	20.00
Primer Annealing	siehe Tabelle 3.1.4.2	15	20.00
Elongation	72	30	20.00
Schmelzprogramm	95	0	20.00
	60	0	20.00
	98	0	0.2
Kühlprogramm	40	10	20.00

Nach Ablauf der PCR wurde der Reaktionsansatz in 1,5 ml-Eppendorf-Cups überführt und bis zum Auftrennen in einer AGE oder für weitere Analysen bei -20 °C gelagert. Für eine kurze Zeit wäre grundsätzlich auch die Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C möglich gewesen.

### Agarose-Gelelektrophorese (AGE)

Aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes konnten DNA-Fragmente in einer Agarosegelmatrix im elektrischen Feld voneinander getrennt und identifiziert werden. Dabei bewegte sich die DNA wegen ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung der Anode. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 1,0-2,0%ige Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer verwendet. Durch die Zugabe von 1 µl/100 ml Ethidiumbromid (1 %ige Lösung), welches in die doppelsträngige DNA interkalierte, wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 6x Probenpuffer aufgenommen. Als Längenstandard wurde die 100 bp DNA Ladder oder die 1 kb plus Ladder (Invitrogen) verwendet. Für die Auftrennung wurde das Agarose-Gel in der mit 1x TAE befüllten Elektrophoresekammer für 1 h bei 80 Volt (die Bromphenollaufront hat das Gel zu  $\frac{3}{4}$  durchlaufen) angeschlossen.

### AGE-Dokumentation

Die Agarose-Gele wurden an der Kodak Image Station 440CF (Kodak IS 440CF) aufgenommen. Hierzu wurde der Filter 4 (590 nm) für fluoreszierende Proben genutzt und das

## Material und Methoden

Gel bei einer Einstellung von 4 Bildern à 15 s Belichtungszeit für ein Bild aufgenommen. Die entstandenen Bilder wurden übereinandergelegt, so dass die Gesamtaufnahme 1 min dauerte. Die UV-Lampe wurde direkt vor der Aufnahme und direkt im Anschluss nach der Aufnahme ein- bzw. ausgeschaltet.

### Aufreinigung von DNA nach PCR oder nach AGE mit dem QIAquick PCR Purification/ Gel Extraction Kit (Qiagen)

Um reine DNA-Fragmente für eine anschließende Sequenzierung zu erhalten, wurden die PCR-Produkte, die in der AGE eine Bande aufwiesen, mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. PCR-Produkte mit mehr als einer Bande in der AGE wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die entsprechenden Banden wurden hierfür zuvor mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten. Die aufgereinigte DNA wurde mit 30 µl des mitgelieferten EB-Puffers eluiert.

### DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe des *AmpliTaQ®FS Big Dye Terminator Kit* der Firma PE AppliedBiosystems sequenziert. Die Methode basiert auf dem 1977 entwickelten Kettenabbruchverfahren nach Sanger [Sanger et al., 1977]. Für die Sequenzreaktion wurden 5 pmol Primer (siehe Tabelle 3.1.4.2 D), 0,6 µg dsDNA und 2 µl Premix (BigDye, PE AppliedBiosystems) eingesetzt. Um den Verlust der ersten Basen, die bei der Forward-Sequenzierung durch die Verwendung derselben Primer entstehen, zu vermeiden, wurde das PCR-Produkt zusätzlich rückwärts sequenziert. Aufgrund der nukleotidspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe im Kit kann die Auftrennung in einem einzigen Gefäß stattfinden. Diese Methode wird als Kapillar-Gelelektrophorese bezeichnet und mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenz erfolgte unter der Verwendung von SeqScape 2.0 (Applied Biosystems).

Die Sequenz-PCR wurde mit folgenden Bedingungen im PCR-Gerät durchgeführt.

Sequenz-PCR-Programm:

2 min 96 °C

30 s 96 °C

15 s 50 °C

4 min 60 °C

4 °C

## **Material und Methoden**

Vor der Sequenzierung wurde die DNA zur Reduktion von Hintergrundsignalen in 55 µl Ethanol (p.A. 100 %) und 2 µl 3 M NaAc, pH 4,6 gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, für mindestens 1 h bei RT getrocknet und durch 2 min Inkubation mit 12,5 µl Formamid bei 90 °C denaturiert.

### Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse wurde mittels BLASTN (Basic local alignment search tool for nucleotides) durchgeführt. Dieses „search tool“ wurde vom National Center for Biotechnology bereitgestellt. Der Suchalgorithmus wurde auf RefSeqRNA und Highly similar sequences (Megablast) eingegrenzt.

### BLASTN

Im Anschluss an die BLASTN-Analyse (nucleotide blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) wurden die Sequenzen auf der UCSC Genome Browser-Webseite mit dem „Tool“ BLAT analysiert (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). Dieses Programm stellte die Sequenz im Genom dar und diente so einer besseren Visualisierung der Analyseergebnisse. Das Programm gab an, bei der Suche nach DNA-Sequenzen mit 95 %iger Übereinstimmung oder mehr bei 25 Basenpaaren oder mehr erfolgreich zu sein. Das Programm BLAT arbeitete, indem es einen Index des gesamten Genoms in Erinnerung behielt. Das Programm BLAT wurde von James Kent geschrieben und war für den interaktiven Gebrauch auf der Webseite frei für jedermann [Kent WJ, 2002].

## **3.2.5 Protein-Analyse**

### Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Geweben

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Geweben wurden 100-150 mg Leber der Maus (frisches oder bei -80 °C gelagertes Material) mit 500 µl Lysispuffer 3 (frisch) versetzt und auf Eis mit dem Ultraschallprozessor homogenisiert (100 % Amplitude, 0,5 Zyklen wurde 3 x 20 s sonifiziert). Dem Homogenat wurden 3 µl Benzonase zugefügt und für 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Homogenat für 20 min bei RT und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Cup überführt und das Pellet erneut mit 500 µl Lysispuffer 3 homogenisiert, inkubiert und zentrifugiert. Die so erhaltenen Überstände wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Der Proteinlösung wurden 5 µl für die Proteinbestimmung mit der HCl modifizierten Bradford-Methode abgenommen.

## **Material und Methoden**

### Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus Zellen

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellen wurden pro Zellpellet 93,75 µl 2x SDS-Puffer zugegeben und mit dH<sub>2</sub>O auf 187,5 µl pro Zellpellet aufgefüllt. In einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen wurden die Zellen für 10 min bei 99 °C im Wasserbad erhitzt. Die DNA wurde durch Sonifizieren auf Eis geschert (Amplitude 100 %, Intervall-Stufe 0,5, 20x). Die Proben wurden 10 min bei RT und 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in Eppendorf-Cups überführt. Es wurde ein Aliquot (20 µl) zur Proteinbestimmung nach Smith abgenommen. Der überführte Überstand entsprach  $\frac{3}{4}$  des finalen Extraktes. Der Überstand wurde gewogen und mit  $\frac{1}{3}$  des Volumens an 4x SDS-Probenpuffer mit  $\beta$ -ME, Glycerin und Bromphenolblau versetzt, gemischt und bei -80 °C gelagert.

### Herstellung von Kernproteinextrakt aus Gewebe

Zur Herstellung von Kernproteinextrakten aus Gewebe wurde frisches mit PBS gespültes Lebergewebe verwendet. Das Gewebe wurde gewogen, mit 1 ml Homogenisierungspuffer versetzt und auf Eis zerkleinert. Das Gewebe wurde weiter mit dem mechanischen Potter homogenisiert. Das Volumen wurde auf 10 ml Homogenisierungspuffer / g Gewebe aufgefüllt. In den Zentrifugenröhrchen wurden 10 ml Homogenisierungspuffer vorgelegt, das Homogenat überführt, mit Homogenisierungspuffer auf das Mindestfüllvolumen aufgefüllt und austariert (die SW32 Tubes hatten ein Mindestfüllvolumen von 28 ml, die SW28.1 Tubes hatten ein Mindestfüllvolumen von 12 ml). Es folgte die Zentrifugation für 60 min bei 24.000 rpm und 2 °C in der Ultrazentrifuge. Nach der Zentrifugation waren vier Phasen erkennbar (ganze Zellen und Membranstücke, Zytoplasma, lysierte Kerne und Kernpellet). Der gesamte Überstand wurde abgenommen. Das Kernpellet wurde in je 1ml NPB-T++ resuspendiert und auf ein 50 % Sucrose / NPB-Kissen gegeben. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C in der Kühlzentrifuge, der Überstand wurde vorsichtig absaugt. Die Pellets wurden in 100 µl Dignam C je Gramm Ausgangsgewebe resuspendiert. Der Kernaufschluss wurde nach 45 min Rotation bei 4 °C unterm Mikroskop kontrolliert. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C in der Kühlzentrifuge. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt, abgemessen und aliquotiert. 4 µl des Überstandes wurden für eine Proteinmessung nach Smith abgenommen.

### Bestimmung der Proteinkonzentration mit der HCL-modifizierten Bradford-Methode

Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde nach der Bradford-Methode [Bradford, 1976] bestimmt. Grundlage der Bradford-Methode ist die Reaktion des Farbstoffes *Coomassie*

## Material und Methoden

*Brilliant Blue G250* mit den Arginin- und Lysin-Resten der Proteine. Es werden hierbei Komplexe gebildet, die ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 595$  nm aufweisen. Der ungebundene Farbstoff zeigt ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 465$  nm. Der Anstieg der Absorption bei  $\lambda = 595$  nm ist proportional zur Proteinkonzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Zur Ermittlung einer Eichgeraden wurden Verdünnungen einer Bovine  $\gamma$ -globulin 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -Stammlösung im Bereich von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hergestellt. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, hierzu wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  der Proteinlösungen in ein 1,5 ml-Eppendorf-Cup mit 20  $\mu\text{l}$  0,12 M HCl und 775  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O pipettiert, gevortext und bei max. 3000 rpm zentrifugiert. Zu jeder Probe wurden 200  $\mu\text{l}$  BioRad Protein Assay Dye Reagent gegeben, ebenfalls gevortext und anzentrifugiert. Je Probe wurden 2x 200  $\mu\text{l}$  Überstand in eine 96-well-ELISA-Platte (Nunc Polysorb) pipettiert und die photometrische Messung bei  $\lambda = 595$  nm am Victor 3 Wallac 1420 Multilabel Counter nach frühestens 5 min, aber spätestens innerhalb der nächsten 55 min, durchgeführt Als Nullwert dienten 5  $\mu\text{l}$  des Lysispuffers 3, mit dem äquivalent zu den Proteinproben verfahren wurde. Anhand der Eichreihe wurde eine Regressionsgerade ( $y = mx + b$ ) ermittelt, die zur Bestimmung der Proteingehalte herangezogen wurde.

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE konnten Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Verwendet wurde hierzu das Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelsystem nach Laemmli [Laemmli et al., 1970].

Zum Aufbrechen höherer Strukturen wurden die Proteinproben, die noch nicht mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt wurden, mit 4x Roti-Load versetzt und 3 min bei 95 °C erhitzt. Die Größe der aufzutrennenden Proteine bestimmte die Polyacrylamidkonzentration der eingesetzten diskontinuierlichen Gele. Es wurden 7-15 %ige Polyacrylamidkonzentrationen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 20 mA pro Gel für 10 min zum Einlaufen und anschließend für ca. 60-90 min bei 25 mA pro Gel in 1x SDS-Laufpuffer. Die Detektion der Proteine erfolgte durch einen Immunblot. Als Größenstandards dienten der BioRad Marker und der Chemicon Marker (5  $\mu\text{l}$  + 0,5  $\mu\text{l}$  in 1x SDS-Probenpuffer).

### Immunblot

Zunächst wurden die Proteine bzw. Proteingemische per SDS-PAGE im Gel aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung der durch SDS denaturierten Proteine konnten diese durch gerichteten Transfer im elektrischen Feld mit Hilfe des Mini Trans-Blot® Electrophoretic

## Material und Methoden

Transfer Cell von BioRad auf eine PVDF-Membran übertragen und immobilisiert werden. Whatman-Papier, Membran und SDS-Gel wurden 10 min in Blotpuffer äquilibriert und entsprechend der Ausrichtung des elektrischen Feldes in die Blotkammer eingespannt. Mit einer Stromstärke von 350 mA pro Tank erfolgte der Transfer für 2-3 h (2 h bei 10-15 % Polyacrylamidkonzentration; 3 h bei 7-9 % Polyacrylamidkonzentration) oder üN bei 90 mA. Anschließend wurden freie Bindungsstellen der PVDF-Membran durch Inkubation mit 5 % Milchpulver (oder 10 x Rotiblock) in TBST bei 4 °C üN oder für 1 h bei RT abgesättigt. Die Erst-Antikörperinkubation erfolgte mit einem gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Antikörper (siehe Tabelle 3.1.3 A und B) für 1 h bei RT oder bei 4 °C üN auf einer Wippe. Die Markierung mit dem Zweit-Antikörper erfolgte mit einem Spezies-spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 3.1.3 C) gegen den verwendeten ersten Antikörper. Vor, zwischen und nach den Antikörperinkubationen erfolgte jeweils ein dreimaliger Waschschrift mit TBST für je 5 min bei RT auf einer Wippe. Abschließend erfolgte der enzymatische Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörper mit dem System der *enhanced chemiluminescence* (ECL, Amersham-Pharmacia Biotech) entsprechend den Herstellerangaben.

### Arbeiten unter Beachtung der generellen Vorschriften zum Umgang mit radioaktiven Stoffen

Der Umgang mit radioaktiven Stoffen wie  $^{32}\text{P}$  war nur in dafür zugelassenen Räumen und in den dafür freigegebenen Mengen möglich. Alle Arbeitsbereiche waren zusätzlich markiert, bei der Durchführung der Arbeiten mussten besondere Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden. Bei der  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-Markierung von DNA-Sonden wurde daher eine Bleischürze angelegt und hinter Plexiglas gearbeitet, alle weiteren Schritte konnten ohne Bleischürze durchgeführt werden. Die Proben, Materialien und Abfälle, die mit  $^{32}\text{P}$  in Berührung gekommen waren, wurden hinter Plexiglas aufgehoben und vom Strahlenschutzbeauftragten entsorgt. Die Arbeitsbereiche wurden vor und nach der Arbeit mit einem Handdetektor auf mögliche radioaktive Kontaminationen untersucht. Zur eigenen Sicherheit wurden Ringdosimeter und Filmplakette getragen, die die Expositionsdosis dokumentieren. Die Expositionsdosis lag vorschriftskonform unterhalb von 1 mSv/a.

### Radioaktive Markierung von DNA

Um die Sonden für den EMSA herzustellen, mussten zunächst die DNA-Oligonukleotide (21 bp Länge) zu einem Doppelstrang gepaart werden. Bei einer Temperatur von 80 °C wurden mögliche Sekundärstrukturen der DNA-Oligos aufgebrochen. Während des langsamen Abkühlungsvorganges lagerten sich die komplementären DNA-Stränge der DNA-Oligos (forward und reverse) aneinander und bildeten einen Doppelstrang (ds). Dieser Vorgang wird

## Material und Methoden

im Allgemeinen als Oligo-Annealing bezeichnet. Der Reaktionsansatz für das Oligo-Annealing setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

je 10  $\mu\text{l}$  der komplementären DNA-Oligos (100 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 5,2  $\mu\text{l}$  10x Annealingpuffer und 26,8  $\mu\text{l}$  TE-Puffer pH 8,0. Der Ansatz wurde für 10 min bei 80 °C im Thermomixer inkubiert, welcher im Anschluss ausgestellt wurde. Der Ansatz wurde über Nacht im Thermomixer gelassen. Die Gelshiftsonden werden bei 4 °C gelagert. Ihre Konzentration betrug 19,23 pmol/ $\mu\text{l}$ .

### <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP Markierung von DNA-Sonden für Gelshiftexperimente

Der Beta-Strahler <sup>32</sup>P gab radioaktive Zerfallsprodukte ab, die emittierten Elektronen konnten von entsprechenden Detektoren (Szintillationszähler, Dosimeter) erfasst werden und bildeten einen Maßstab für die aktuelle Aktivität der Probe. Für die Herstellung der <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP-markierten DNA-Sonden wurden folgende Komponenten im Eisbad zusammengefügt:

*11  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O*  
*2  $\mu\text{l}$  10x T4-Kinase-Puffer*  
*2  $\mu\text{l}$  ds DNA-Oligo (1,923 pmol/ $\mu\text{l}$ )*  
*1  $\mu\text{l}$  T4-Kinase*  
*4  $\mu\text{l}$  <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP*

Der Ansatz wurde mit der Pipette gemischt, abzentrifugiert und im Thermomixer für 30-45 min bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  1 % SDS/100 mM EDTA-Lösung gestoppt. Die Reaktion wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und auf eine Microspin G-25 Column gegeben. Die Gelmatrix der Microspin G-25 Column wurde zuvor resuspendiert und der Puffer durch Zentrifugation (1 min, 3000 rpm) entfernt. Die Probe wurde auf das Gelmaterial pipettiert und für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 50  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O versetzt. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden bis zum Einsatz im Gelshiftexperiment bei 4 °C gelagert. Die Aktivität der DNA-Sonden wurde in einer 3-fach-Bestimmung mit je 1  $\mu\text{l}$  Sonde im Beckman Counter LS 6500 durchgeführt.

### Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (Gelshiftexperiment) diente dem spezifischen Nachweis von DNA-bindenden Proteinen in einem Kernextrakt. Der Nachweis erfolgte über das aufgrund der Größe des DNA-Protein-Komplexes veränderte Laufverhalten einer

## Material und Methoden

radioaktiv markierten DNA-Sonde in der nicht-denaturierenden PAGE. Die DNA-Sonde musste spezifisch für das gesuchte Protein sein. Als Kontrollen dienten Antikörper gegen das zu untersuchende Protein oder die Konkurrenz mit kalten DNA-Sonden. Für ein 6 % Polyacrylamid-Gel wurden folgende Substanzen zusammen pipettiert:

*30 ml dH<sub>2</sub>O*

*2,0 ml 5 x TBE*

*8 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)*

*280 µl 10 % APS*

*28 µl TEMED*

Die Lösung wurde mit einer serologischen Pipette luftblasenfrei zwischen die Platten gegeben und der Kamm gesteckt, danach wurde das Gel für 1 h auspolymerisiert. Das Gel wurde im Kühlraum in eine mit 0,25 x TBE befüllte Elektrophoresekammer gespannt.

Probenvorbereitung:

In jede Spur wurden 25 µl der unten angegebenen Bestandteile pipettiert. Das zu verwendende Volumen der markierten DNA-Sonde errechnete sich aus der aktuellen Aktivität.

Volumen radioaktiv markierte Sonde =  $1 \cdot 10^5 \text{ cpm} / \text{Aktivität} [\text{cpm}/\mu\text{l}] \cdot \text{Anzahl Ansätze}$

Die Volumina der markierten Sonde und des eingesetzten Wassers ergänzten sich zu 3 µl je Spur. Wurde mit Konkurrenz gearbeitet, so betrug das Volumen in den Konkurrenzreaktionsgefäßen jeweils 3 µl, wobei die kalte Sonde in 100-facher Konzentration zur <sup>32</sup>P-γ-ATP-markierten Sonde vorlag.

Ansatz	1x
Kernextrakt	5-15 µg
Antikörper	1,0 µl
kalte Sonde mit H <sub>2</sub> O (100x)	3,0 µl
<sup>32</sup> P-γ-ATP-markierte Sonde (1x10 <sup>5</sup> cpm/Spur) mit H <sub>2</sub> O	3,0 µl
5x BB	5,0 µl
Protease-Inhibitoren-Cocktail	2,5 µl
2 µg/µl BSA	1,0 µl

## Material und Methoden

Verdünnungspuffer DP	ad to 25 µl
----------------------	-------------

Für jede Sonde wurden folgende Kontrollen mitgeführt:

1. Ansatz mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-markierte Sonde
2. Ansatz mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-markierte Sonde und Kernextrakt
3. Ansatz mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-markierte Sonde, Antikörper und Kernextrakt
4. Ansatz mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-markierte Sonde, Konkurrenz wt und Kernextrakt
5. Ansatz mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP-markierte Sonde, Konkurrenz mut und Kernextrakt

Da nicht alle Antikörper für Gelshiftexperimente geeignet waren, wurden als Variation zu Ansatz (3.) statt des Antikörpers gegen das zu untersuchende Protein 0,5 µg des zu untersuchenden Proteins eingesetzt. Hierdurch verstärkte sich die spezifisch „geschiftete“ Bande.

Die Ansätze wurden für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Dem Gel wurde für 30 min eine Spannung von 150 Volt angelegt. Die Ansätze wurden nach der Inkubationszeit mit 2,5 µl 20 % Ficoll versetzt, die Ansätze gemäß (1.) zusätzlich mit 2,5 µl Ladebuffer. Der gesamte Ansatz wurde in die Geltaschen pipettiert und für 2 h eine Spannung von 300 Volt angelegt. Die Lauffront lag 5 cm oberhalb des Gel-Endes. Im Anschluss wurden die Proben im Gel für 20 min in Fixierlösung fixiert, auf 3 MM Whatman<sup>TM</sup>-Filterpapiere transferiert und mit Frischhaltefolie überspannt. Das Gel-Paket wurde auf dem Geltrockner für 90 min bei 75 °C getrocknet und dann in eine Expositionskassette überführt. Zur Exposition wurden Phosphor-Storage-Screen K (BioRad) für 6 h, 16 h und 72 h aufgelegt. Die Digitalisierung der Screens erfolgte am Molecular Imager FX, mit dem der Screen gescannt wurde.

### 3.2.6 Microarray-Analyse

Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte bei der Bearbeitung und Auswertung der GeneChips beschrieben. Die englischen Originalbezeichnungen und Abkürzungen wurden weitgehend beibehalten, um Ungenauigkeiten bei der Übersetzung zu vermeiden. Zusätzlich zur Microarray Suite 5.0 von Affymetrix (Beschreibung der Algorithmen unter [www.affymetrix.com/products/statistical\\_algorithms\\_reference\\_guide\\_content.html](http://www.affymetrix.com/products/statistical_algorithms_reference_guide_content.html)) wurden die ArrayTrack<sup>TM</sup> software und die Xray (Excel® Array Analysis) Software von (Biotique Systems) zur Auswertung herangezogen. Es wurden eine „Significance Analysis of Microarrays“ (SAM) nach [Tusher, VG. et al., 2001], eine PCA (Principal component

## Material und Methoden

analysis) und eine HCA (hierarchical gene cluster analysis) durchgeführt. Die Xray (Excel® Array Analysis) Software (Biotique Systems) ermöglichte die statistische Auswertung von Microarray-Experimenten, wobei neben Genen mit einer veränderten Genexpression auch alternatives Spleißen identifiziert werden konnte.

### Beschreibung der Genchips

Es wurden GeneChip Murine Genome U74Av2 Array (MG-U74Av2) sowie GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array® (Fa. Affymetrix, Santa Clara, CA) verwendet.

### Array MG-U74Av2

Der Array bestand aus einer Fülle von mehr als 36.000 Maus Genen und ESTs („Expressed Sequence Tag“) der Mouse UniGene-Datenbank. Die Bearbeitung dieser Genchips erfolgte durch Katrin Hoffmann im Rahmen ihrer Diplomarbeit. Insgesamt wurden 22 Genchips bearbeitet. Dazu wurden 10 µg RNA für die Synthese der Biotin-markierten cRNA benutzt. Die weiteren Schritte waren die cDNA Produktion, *in vitro* Transkription und Biotinisierung bis hin zur cRNA-Fragmentierung und -Hybridisierung auf dem Array. Nach der Hybridisierung erfolgte das Waschen und Scannen der Arrays mit dem Agilent GeneArray® Scanner. Die gescannten Image Files wurden visuell auf Artefakte inspiziert und dann analysiert. Um die Arrays miteinander zu vergleichen, wurde jedes Image File auf denselben Sollwert skaliert, dies entsprach bei allen Probe Sets einer Intensität von 150. Für die weitere Analyse wurde mit der GeneChip® Operating Software (GCOS; Version 1.1) gearbeitet. Diese kontrollierte die Fluid Station und den Scanner, generierte die Array-Daten der verschiedenen Proben und analysierte die Intensität der Hybridisierungsdaten. Für die Analyse der einzelnen Arrays wurden die voreingestellten Parameter des Affymetrix data analysis software package verwendet. Wie vom Hersteller beschrieben, wurde die Expression eines Gens bekräftigt durch ein Set von etwa 16 Probenpaaren, die direkt auf die Chipmatrix auf einer Fläche von ~20 µm<sup>2</sup> synthetisiert waren. Diese Fläche wurde als Probenzelle bezeichnet und enthielt ca. 10<sup>7</sup> Kopien eines Oligonukleotids von durchschnittlich 25 Basenpaaren Länge. Die Sequenz dieses Oligonukleotids entsprach exakt derjenigen einer cDNA und wurde daher mit PM (Perfect Match) bezeichnet. Neben dem Perfect Match gab es direkt unter der PM-Zelle die gleiche Sequenz mit einem Basenaustausch in der Mitte, die mit MM (Mismatch) bezeichnet wurde. Das MM-Oligomer diente der Kontrolle von unspezifischen Bindungen. Ein Probenpaar (PP) bestand aus einer PM- und einer MM-Zelle. 16 Probenpaare nebeneinander entsprachen 16 verschiedenen Sequenzen einer cDNA und wurden als

## Material und Methoden

Probenset (PS) bezeichnet. Mittels des vom Hersteller empfohlenen statistischen Algorithmus wurde mit der Affymetrix® Microarray Suite 5.0 Software der Hybridisierungswert für jedes Gen in dieser Arbeit kalkuliert.

Nähere Ausführungen zur statistischen Auswertung erfolgen unter dem Punkt „Statistische Algorithmen für die Auswertung der Genchips“.

### GeneChip® Mouse Exon 1.0 ST Array

Der Array bestand aus einer Fülle von mehr als 1,2 Millionen Probe Sets, ~ 1 Million Exon Clustern, 266.220 Putative Full-Length mRNAs, 266.791 Ensembl Transkripten, 554.003 ESTs und 835.897 Gene Predictions. Wie vom Hersteller beschrieben, wurde die Expression eines Gens durch ein Set von etwa 40 Probenpaaren bekräftigt, wobei vier Probenpaare für ein Exon zur Verfügung standen. Die Methode verfügte über ein „random priming“, wodurch sense Targets über die gesamte Länge des Transkriptes erzeugt werden konnten. Im Gegensatz dazu synthetisierte der MG-U74Av2 Array Transkripte vom 3`-Ende und hatte daher dort eine stärkere Gewichtung. Der Mouse Exon 1.0 ST Array® war somit sowohl zu einer „Whole Genome“-Analyse als auch zu einer Analyse auf alternatives Spleißen in der Lage.

In den folgenden Abschnitten wird der Ablauf der Probenvorbereitung für die Analyse eines GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array® besprochen. Die Probenvorbereitung unterteilt sich in folgende Schritte:

- rRNA-Reduktion
- Erster Ablauf, Erststrang cDNA-Synthese
- Erster Ablauf, Zweitstrang cDNA-Synthese
- cRNA-Synthese
- Zweiter Ablauf, Erststrang cDNA-Synthese
- Hydrolyse der cRNA
- Fragmentierung der Einzelstrang-DNA
- Terminales Labeln (Herstellung Biotin-markierter cRNA)

Die weiteren Schritte setzen sich zusammen aus:

- Hybridisierung der Genchips
- Waschen und Färben der Genchips
- Scannen der Chips

## Material und Methoden

Eine Übersicht der einzelnen Schritte (1-8) der Probenvorbereitung ist der schematischen Darstellung in Abb. 3.2.6 zu entnehmen.

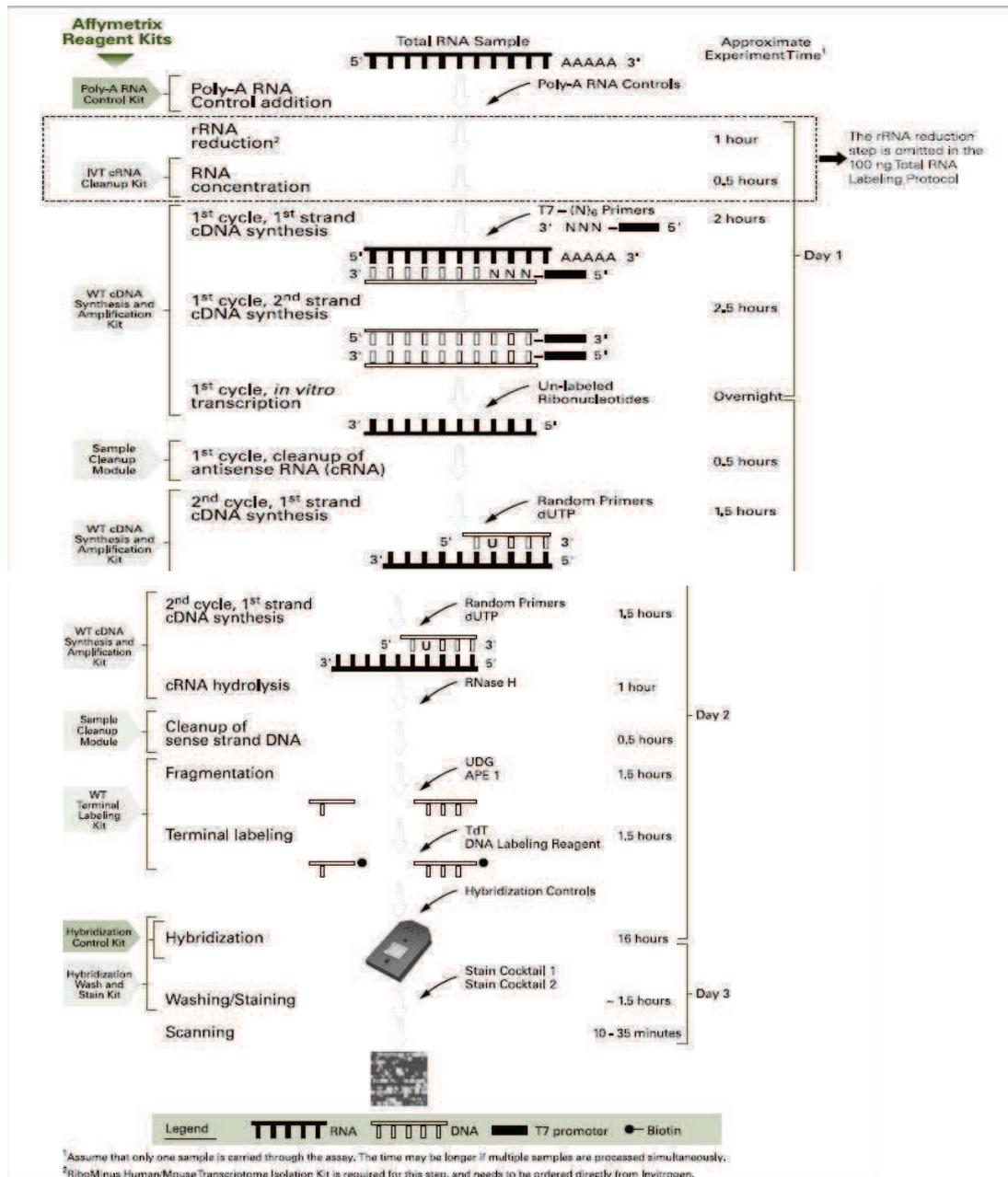


Abb. 3.2.6: Schematische Darstellung der Schritte (1-8) der Probenvorbereitung

### rRNA-Reduction, Aufkonzentrierung und Reinigung

Die Reduktion der ribosomalen RNA wurde für die Benutzung der GeneChip® Exon 1.0 ST Arrays mit 1 µg Total-RNA mit dem RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit (Invitrogen), optimiert für GeneChip® Arrays von Affymetrix, durchgeführt.

Hierfür wurden folgende Bestandteile zusammen pipettiert:

Bestandteile	
Total-RNA	1 µg

## Material und Methoden

Betain, 5M	54 µl
Invitrogen Hybridisierungspuffer	126 µl
Gesamtvolumen	180 µl

Die Komponenten der RiboMinus-Sonden-Hybridisierung wurden auf Eis in einem 0,2-0,5 ml-Reaktionsgefäß zusammen pipettiert.

Menge Total-RNA	1 µg
RNA Konzentrationsbereich	0,31 µg/µl - 1 µg/µl
<b>RiboMinus-Sonden Hybridisierung</b>	
Total-RNA/ Poly-A-Kontroll- Mix	bis 5,2 µl
RiboMinus-Sonde (100 pmol/µl)	0,8 µl
Hybridisierungspuffer + Betain	30 µl
Gesamt-Hybridisierungsvolumen	36 µl
<b>Vorbereitung der Beads</b>	
Magnetische Beads	50 µl
2X Waschen mit Wasser	50 µl
1X Waschen mit Hybridisierungspuffer +Betain	50 µl
Resuspendieren der Beads mit Hybridisierungspuffer + Betain	20 µl
Finales Waschen der Beads mit Hybridisierungspuffer+ Betain	50 µl
<b>Aufkonzentrierung und Reinigung</b>	
Volumen des Überstands	~100 µl
cRNA-Bindungspuffer	350 µl
100 % Ethanol	250 µl
Gesamtvolumen, das auf die Säule gegeben wird	~700 µl
cRNA-Waschpuffer	500 µl
80 % Ethanol	500 µl

Der Ansatz wurde gemischt, zentrifugiert und im Thermocycler bei 70 °C für 5 min inkubiert. Die Beads wurden entsprechend dem Affymetrix-Protokoll vorbereitet. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Aufreinigung der Reaktion. Die Aufkonzentrierung der rRNA-reduzierten RNA (ca. 100 µl nach Elution von den Beads) erfolgte mit dem GeneChip IVT cRNA Cleanup Kit nach Herstellerangaben. Es wurde mit 11 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

### Erster Ablauf, Erststrang cDNA-Synthese

Die Erststrang cDNA-Synthese erfolgte mit dem GeneChip® WT cDNA Synthesis Kit (Affymetrix). Hierbei wurden 4 µl der rRNA-reduzierten RNA mit 1 µl T7-(N6) Primerlösung (500 ng/µl) versetzt und im Thermocycler 5 min bei 70 °C und mindestens 2 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 2 µl 5x 1st Strand Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 0,5 µl dNTP Mix

## Material und Methoden

(10 mM), 0,5 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Super Script II hinzu pipettiert. Die Reaktion wurde im Thermocycler 10 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C, 10 min bei 70 °C und mindestens 2 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zweitstrang cDNA-Synthese mit dem GeneChip® WT cDNA Synthesis Kit (Affymetrix).

### Erster Ablauf, Zweitstrang cDNA-Synthese

Für die Zweitstrang cDNA-Synthese mit dem GeneChip® WT cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) wurden 10 µl der folgenden Bestandteile zu den Reaktionsansätzen aus der Erststrang cDNA-Synthese pipettiert.

Bestandteile	
RNase-freies Wasser	4,8 µl
MgCl <sub>2</sub> , 17,5 mM	4 µl
dNTP Mix, 10 mM	0,4 µl
DNA Polymerase I	0,6 µl
RNase H	0,2 µl

Die Reaktion wurde im Thermocycler für 2 h bei 16 °C (ohne Deckelheizung), 10 min bei 75 °C (mit Deckelheizung), 2 min bei 4 °C inkubiert.

### cRNA-Synthese

Für die cRNA-Synthese wurden 5 µl 10x IVT Puffer, 20 µl IVT NTP Mix und 5 µl IVT Enzym-Mix zu der cDNA-Synthesereaktion pipettiert und für 16 h (üN) bei 37 °C im Thermocycler inkubiert.

### Zweiter Ablauf, Erststrang cDNA-Synthese

Nach Aufreinigung der cRNA wurde mit dem GeneChip® WT cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) die zweite Erststrang cDNA-Synthese durchgeführt. Hierzu wurden 10 µg (mindestens aber 8 µg) cRNA mit 1,5 µl Random Primer (3 µg/µl) versetzt und in einem Gesamtvolumen von 8 µl im Thermocycler für 5 min bei 70 °C, 5 min bei 25 °C und mindestens 2 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 4 µl 5x 1st-Strand Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1,25 µl dNTP+ UTP (10 mM) und 4,75 µl Super Script II pipettiert und im Thermocycler 10 min bei 25 °C, 90 min bei 42 °C, 10 min bei 70 °C und mindestens 2 min bei 4 °C inkubiert.

## **Material und Methoden**

### Hydrolyse der cRNA

Die Hydrolyse der cRNA erfolgte durch Zugabe von 1 µl RNase H zum zuvor beschriebenen Reaktionsmix und eine Inkubation im Thermocycler für 45 min bei 37 °C, 5 min bei 95 °C und 2 min bei 4 °C. Die ss-cDNA wurde im Anschluss mit dem GeneChip® Sample Cleanup Module (Affymetrix) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Eluiert wurde zweimal mit 15 µl cDNA-Elutionspuffer.

### Fragmentierung der Einzelstrang-DNA

Für die Fragmentierungsreaktion wurden folgende Bestandteile zusammen pipettiert: 5,5 µl ss-cDNA (mit RNase-freiem Wasser auf 31,2 µl) und 16,8 µl des Fragmentierungs-Mix (10 µl RNase-freies Wasser, 4,8 µl 10x cDNA-Fragmentierungspuffer, 1,0 µl UDG (10 U/µl) und 1,0 µl APE1 (1000 U/ µl)) wurden gemischt und für 60 min bei 37 °C, 2 min bei 93 °C und mindestens 2 min bei 4 °C im Thermocycler inkubiert.

### Terminales Labeln (Herstellung Biotin-markierter cRNA mit dem GeneChip® WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix))

Für das Labeling wurden 45 µl der fragmentierten ss-cDNA verwendet. Hierzu wurden 12 µl 5x TdT-Puffer, 2 µl TdT und 1 µl DNA Labeling-Reagenz (5 mM) vermischt und im Thermocycler für 60 min bei 37 °C, 10 min bei 70 °C und mindestens 2 min bei 4 °C inkubiert.

### Hybridisierung der Exon Arrays mit dem GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit

Für die Hybridisierung wurden ~ 60,0 µl fragmentierte, gelabelte cDNA, 3,7 µl Control Oligonucleotide B2 (3 nM), 11 µl 20x Eukaryotic Hybridization Controls (bioB, bioC, bioD, cre), 110 µl 2x Hybridization Mix, 15,4 µl DMSO und RNase-freies Wasser bis zu einem Volumen von 220 µl zusammen pipettiert, für 5 min im Thermomixer auf 99 °C erhitzt und dann 5 min bei 45 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Hybridisierungscocktail für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Arrays wurden mit 200 µl des „Pre-Hybridization Mix“ befüllt und für 10 min bei 45 °C im Hybridisierungssofen bei 60 rpm rotiert (während der Inkubationszeit des Hybridisierungscocktails). Danach wurde der „Pre-Hybridization Mix“ entfernt und durch 200 µl Hybridisierungscocktail ersetzt. Die Arrays hybridisierten bei 45 °C, 60 rpm für 17 h ± 1 h.

## **Material und Methoden**

### Waschen und Färben der Genchips mit dem GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit

Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungscocktail aus den Arrays entnommen und bei -80 °C aufbewahrt. Für das „PRIMING“-Programm wurden die Arrays mit Waschpuffer A befüllt und in die vorbereitete Fluidics Station gespannt. Es wurde das für die GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array® entsprechende „Wash und Stain“-Programm FS450\_0001 verwendet.

### Scannen der Chips

Das Scannen der Arrays erfolgte am GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix). Für einen GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array® wurden ca. 35 min benötigt. Im Anschluss an das Scannen wurde eine visuelle Qualitätskontrolle durchgeführt. Dazu wurden die Felder nach Artefakten und Unregelmäßigkeiten abgesucht. War die betroffene Fläche <10 % (Angaben des Herstellers, Affymetrix), so war nicht von einer Beeinträchtigung der Auswertung auszugehen. Bei einer betroffenen Fläche >10 % hätte die Hybridisierung mit demselben Hybridisierungs Cocktail oder einer neu fragmentierten cRNA-Probe und einem neuen Chip wiederholt werden müssen.

Der gescannte Chip wurde in einer sogenannten DAT-Datei gespeichert, bei der jede Probenzelle aus 64 Pixeln (8x8 Pixel) definiert war. Aus diesen 64 Pixeln wurde ein einzelner Intensitätswert für jede Probenzelle berechnet, der das Hybridisierungslevel für diese Probenzelle repräsentierte. Dazu wurden die begrenzenden 28 Pixel ausgeschlossen und die Intensitätsverteilung für die verbleibenden 36 Pixel berechnet. Der Intensitätswert, der mit der 75 %-Perzentile der Verteilung assoziiert ist, wurde als Durchschnittswert (Average Intensity) für die Probenzelle genutzt. Diese Information wurde dann in der CEL-Datei gespeichert. Die Arraydaten wurden mit der „scaling bzw. Per chip Normalisation“ normalisiert. Hierdurch wurde die totale bzw. durchschnittliche Intensität von jedem Array annähernd identisch. Die Microarray Chips wurden mit der GCOS (GeneChip Operating Software, Affimetrix) analysiert. Es wurden alle „default settings“ benutzt. Das Target Signal wurde auf 500 gesetzt und zur Generierung einer Microarray-Qualitätskontrolle und eines Ergebnisberichtes benutzt. Die CEL-Dateien wurden aus GCOS exportiert und in die ArrayTrack software (National Center for Toxicological Research, U.S. FDA, Jefferson, AR, USA (NCTR/FDA)) geladen. Hier wurden die Daten mit der Total Intensity-Normalisierung normalisiert und nach einer Korrektur der Hintergrundsignale wurden die Daten analysiert. Die ArrayTrack software enthielt hierzu einige bioinformatische Softwares wie ANOVA, T-test und SAM. Beim „unpaired one-sided T-Test“ wurde der p-Wert zu einem „two-sided p-Wert“ konvertiert und

## Material und Methoden

die Ausschlussgrenze des p-Wertes bei 0,05 gewählt. Diese Umwandlung wurde verwendet, um die Richtung und Bedeutung der Veränderung der Expressionshöhe eines Transkriptes zwischen zwei verschiedenen Sätzen zu bestimmen.

### Statistische Algorithmen für die Auswertung der Genchips

Im Folgenden werden Parameter aufgeführt, die eine Beurteilung der Messdaten gestatten. Eine ausführliche Beschreibung der Parameter ist im „Statistical Algorithms Description Document“ (Affymetrix) sowie im Affymetrix Data Mining Tool User’s Guide aufgeführt. Hier folgt ein kurzer Überblick über die einzelnen Schritte: Aus den einzelnen Pixeln für jede Fläche wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität ermittelt. Im Anschluss wurde ein Vergleich aller einem Gen zugehörigen PM-MM-Paare vorgenommen und ihr Verhältnis bestimmt. Hierdurch konnte geklärt werden, ob ein Paar als „positiv“ oder „negativ“ anzusehen ist (Pos/Neg Ratio). Unter der sogenannten „Average Difference“ (AvgDiff) versteht man im Allgemeinen ein relatives Maß für den Expressionsgrad eines Gens, welches aus der durchschnittlichen Differenz der „Average Intensities“ von PM-MM-Paaren berechnet wird und somit die umfassende Beurteilung aller Zellen eines Gens darstellt.

Gleichung:

$$\text{AvgDiff} = \text{Summe}(\text{PM-MM}) / (\text{Anzahl der Paare})$$

Diese Berechnung war die Grundlage für die Berechnung des „Absolut Call“, welcher bestimmte, ob ein Transkript auf dem Chip hybridisiert ist oder ob dies nicht der Fall ist. (Present/Marginal/Absent; P/M/A). Der Absolut Call wurde über eine Entscheidungsmatrix bestimmt. Bei einer Vergleichsanalyse wurden diese Messdaten als Basislinie definiert und die Werte des experimentellen Chips als Differenz zur Basislinie berechnet. Mit Hilfe der Entscheidungsmatrix wurde ein „Difference Call“ ermittelt. Das Gen des experimentellen Chips konnte im Vergleich zur Baseline einer der folgenden Regulationsmöglichkeiten entsprechen: „Increase, Marginally Increase, Marginally Decrease, Decrease oder No Change“ (I, MI, MD, D, NC). Der Fold Change (x-fache Änderung) stellt im Allgemeinen eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression dar. Der Wert ist positiv, wenn das Transkript des experimentellen Chips gegenüber dem des Kontroll-Chips erhöht ist, beziehungsweise negativ, wenn dieses geringer ist. Der Fold Change wurde auf Grundlage der Average Difference Change berechnet, die wie folgt definiert ist:

$$\text{AvgDiffChange} = \text{AvgDiff}(\text{Experiment}) - \text{AvgDiff}(\text{Kontrolle})$$

Nach Affymetrix wird die Wahrscheinlichkeit/ Zuverlässigkeit des Detection Call mit dem p-Wert angegeben. Die Ausschlussgrenzen sind hierzu wie folgt angegeben:

## Material und Methoden

Present (p-Wert: 0-0,04); Marginal (p-Wert: 0,04-0,06); Absent (p-Wert: 0,06-0,1)

Die Wahrscheinlichkeit/ Zuverlässigkeit des Change Call wird mit dem p-Wert angegeben. Die Ausschlussgrenzen sind hierzu wie folgt definiert:

Increase (p-Wert: 0-0,0025), Marginally Increase (p-Wert: 0,0025-0,003), Marginally Decrease (p-Wert: 0,997-0,9975), Decrease (p-Wert: 0,9975-1) oder No Change (p-Wert: >0,003 sowie <0,997)

Die Zuverlässigkeit einer relevanten Zunahme eines differentiell exprimierten Gens erhöht sich, je mehr sich der Change p-Wert gegen 0 nähert. Die Wahrscheinlichkeit einer relevanten Abnahme steigt, wenn sich der p-Wert 1 nähert. Liegt der p-Wert um 0,5, besteht keine Änderung.

### „Single Array“-Analyse

Die „Single Array“-Analyse ermittelt im Allgemeinen die Daten des Expressionsprofils der verwendeten RNA. Sie war die Grundlage, um Vergleiche zwischen „experiment“- und „baseline“-Chips (Kontroll-Chip) durchzuführen. Diese Analyse erzeugte einen „detection p-value“, einen „detection call“ und ein „signal“. Der „detection p-value“ wurde folgendermaßen bestimmt: Für jedes Probenpaar wurde der „discrimination score“ (R) ermittelt  $\{R = (PM - MM) / (PM + (MM))\}$ , der das Verhältnis der spezifischen Intensität (PM-MM) zur Gesamtintensität (PM+MM) angab. Die Berechnung des „detection p-values“ basierte auf der nichtparametrischen Methode nach Wilcoxon. Dabei wurde der „discrimination score“ für jedes Probenpaar gegen einen benutzerdefinierten Grenzwert  $\tau$  getestet (empfohlener Wert: 0,015) und ein Rang dafür bestimmt, wie weit R von  $\tau$  entfernt ist. Je größer dabei die Differenz war, desto kleiner wurde der „detection p-value“. Dieser Parameter wurde dann für den „detection call“ verwendet, der „present“, „marginal“ und „absent calls“ definierte, indem er mit den benutzerdefinierten Grenzwerten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  verglichen wurde. Im Allgemeinen definieren „Detection p-values“  $< \alpha_1$  (empfohlener Wert 0,04) einen „present call“, Werte zwischen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  (empfohlener Wert 0,06) einen „marginal call“ und „p-values“  $< \alpha_2$  einen „absent call“. Die „signal“-Werte repräsentierten die relative Expressionshöhe eines Transkripts auf dem jeweiligen Probenstet. Die Berechnung beruhte auf dem „One StepTukey`s Biweight Estimate“ (<http://mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>).

In einem Probenpaar wurde mit Hilfe von „signal rules“ aus der MM-Intensität ein sogenanntes Streusignal ermittelt, das von der Intensität des PM subtrahiert wurde. Diese

## Material und Methoden

„echte“ Intensität wurde dann logarithmiert (zur Basis 2) und entsprechend ihrem Abstand zum Durchschnitt aller Probenpaare gewichtet. Damit konnte vermieden werden, dass Ausreißer das „signal“ verfälschten. Der Durchschnitt der gewichteten Intensitätswerte entsprach dann dem metrischen „signal“, das in der CHP-Datei angegeben wurde.

### Vergleichsanalyse und lineare Normalisierung

In der Vergleichsanalyse wurden zwei Genchips desselben Typs miteinander verglichen, um Änderungen in der Genexpression zwischen „experiment“ und „baseline“ zu detektieren und zu quantifizieren. Die verwendeten Algorithmen ermittelten einen „change p-value“, einen „change call“ und eine „signal log ratio“. Bevor die Vergleichsanalyse durchgeführt wurde, mussten die biologischen und technischen Variationen zwischen den zu vergleichenden Chips korrigiert werden. Die Intensitäten der Probensets des „experiment“-Chips wurden mit einem Faktor linear auf die Intensitäten des „baseline“-Chips normalisiert. Analog zu der „single array“-Analyse wurde in der Vergleichsanalyse auch der Wilcoxon Test angewandt. Jedes Probenset des „baseline“-Genchips wurde mit dem entsprechenden Probenset des „experiment“-Chips verglichen. Es wurde ein „change p-value“ berechnet, der ein Ansteigen (p-Werte nahe 0), ein Abfallen (p-Werte nahe 1) oder keine Änderung (p-Werte um 0,5) in der Genexpression angab. Die Werte wurden mit benutzerdefinierten Grenzwerten  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  verglichen und folgende „change calls“ ermittelt: „increase“, „marginal increase“, „no change“, „decrease“ oder „marginal decrease“. Die „signal log ratio“ gab die Größe und Änderungsrichtung eines Transkripts in der Vergleichsanalyse an. Wie bei der „single array“-Analyse wurde die „Tukey’s Biweight“-Methode angewandt, um Ausreißer zu eliminieren. Die Probenpaar-Intensitäten der beiden Chips wurden miteinander verglichen und die „signal log ratios“ entsprechend ihrem Abstand zum Durchschnitt aller „Probenpaar-Ratios“ gewichtet. In der CHP-Datei wurden zusätzlich zu der „signal log ratio“ noch die niedrigste („signal log ratio low“) bzw. größte („signal log ratio high“) Ratio eines Probenpaars angegeben.

### Linearer Korrelationskoeffizient (nach Pearson)

Der lineare Korrelationskoeffizient  $r$  (nach Pearson) stellt im Allgemeinen ein Maß für die Stärke des linearen Zusammenhanges dar. Gibt es einen starken Zusammenhang, so ist es möglich, eine Regressionsgerade in die Punktwolke zu legen. Der lineare

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

## Material und Methoden

Korrelationskoeffizient  $r$  (nach Pearson) beschreibt hierbei, wie sehr die Punkte sich der

Geraden annähern. Er wird definiert mit folgender Gleichung:

Für  $r$  gilt:  $(-1 \leq r \leq +1)$ . Ist  $r > 0$  handelt es sich um eine positive Korrelation (d.h. die Regressionsgerade hat eine positive Steigung), ist  $r < 0$  handelt es sich um eine negative Korrelation (Regressionsgerade mit negativer Steigung). Je näher der Betrag von  $r$  ( $|r|$ ) bei 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang und desto dichter liegen die Punkte ( $x_i / y_i$ ) an der Regressionsgeraden. Je näher der Betrag von  $r$  bei 0 liegt, desto weiter ist die Punktwolke um die Regressionsgerade gestreut und desto schwächer ist der Zusammenhang ( $|r| \leq 0,2$  keine statistische Bedeutung,  $0,2 < |r| \leq 0,4$  schwache Korrelation,  $0,4 < |r| \leq 0,75$  mittlere Korrelation,  $|r| > 0,75$  starke Korrelation).

### ArrayTrack™ Software

Für die weitere Analyse wurden die CEL Dateien aus GCOS in die ArrayTrack™ Software (National Center for Toxicological Research, U.S. FDA, Jefferson, AR, USA (NCTR/FDA)) geladen. Für die Normalisierung wurde nach Abzug des Hintergrundes die Total Intensity Normalisation benutzt und im Anschluss die weiteren Analysen durchgeführt. Bei der Total Intensity Normalisation wurde angenommen, dass sich die Expressionsniveaus der verschiedenen Versuchsbedingungen nicht signifikant ändern. Bei dieser Normalisierung wurde jeder Fluoreszenzintensitätswert durch die Summe aller Fluoreszenzintensitätswerte geteilt.

Mit  $r$  als dem Verhältnis dieser Summe, d. h.  $(\text{sum ch1 vals})/(\text{sum ch2 vals})$ , ergab sich für den Skalierungsfaktor für den ersten Kanal  $\text{ch1} = 1/\text{sqrt}(r)$  und für den Kanal 2  $\text{ch2} = \text{sqrt}(r)$ . Diese Normalisierung war nur möglich, weil die Daten folgende Eigenschaften hatten: Das Verhältnis der Summe der berechneten normalisierten Daten sollte 1 sein und jeder Punkt wurde so angeglichen, dass der Kanalwert  $1/r$  mal sein nichtnormalisierter Wert war.

Um eine signifikante Genliste zu erstellen, wurde ein T-Test mit den folgenden Kriterien durchgeführt:  $p\text{-Wert} < 0.05$ ;  $\text{mean channel intensities} > 100$ ;  $\text{bad flags} \leq 2$  und  $\text{abs fold-change} > 1.6$ . Ferner wurde nach erfolgter Normalisierung der verschiedenen Chips für die Detektion von differentiell exprimierten Genen die permutationsbasierte Methode „SAM“ (Significance Analysis of Microarrays) nach Tusher angewandt [Tusher et al., 2001]. Als erster Schritt wurde die relative Differenz der Genexpression bei verschiedenen Versuchsbedingungen unter Berücksichtigung der Variabilität in den verschiedenen Replikaten berechnet. Der Datensatz wurde dann in 100 Zyklen permutiert und die relativen

## Material und Methoden

Differenzen auf Basis der permutierten Daten neu kalkuliert. Hierzu wurde der „two class unpaired data mode“ des Algorithmus benutzt. Im Allgemeinen gilt, dass für die Mehrzahl der Gene die Werte aus originalen und permutierten Datensätzen ungefähr gleich sind. Gene, bei denen sich diese Werte um mehr als einen bestimmten Grenzwert unterscheiden, werden als differentiell exprimiert definiert. Basierend auf der Anzahl der Gene, die bei einem bestimmten Grenzwert definiert wurde, wurde eine Fehlerquote (false detection rate, FDR) errechnet. Als Ausschlussgrenze für die Signifikanz wurde ein FDR von 0,05 gewählt sowie ein Fold-change von  $\leq 2$  bei den differentiell regulierten Genen.

### Principal component analysis (PCA) und hierarchical cluster analysis (HCA)

Bei PCA und HCA handelte es sich um zwei verschiedene Clusterverfahren, die genutzt wurden, um Ähnlichkeitsstrukturen in großen Datenmengen zu entdecken. Bei der Clusteranalyse war das Ziel, neue Gruppen in den Daten zu identifizieren. Diese Verfahren galten als „uninformierte Verfahren“, da sie nicht auf Klassen-Vorwissen angewiesen waren. Die Clusteralgorithmen wurden hier benutzt, um vorhandenes Wissen zu reproduzieren und die unterschiedlichen Experimentgruppen wiederzufinden. Die PCA (Hauptkomponentenanalyse) wurde nach Karl Pearson durchgeführt [Pearson K, 1901]. Sie diente dazu, umfangreiche Datensätze zu strukturieren, zu vereinfachen und zu veranschaulichen. Die umfangreichen Datensätze wurden dazu einer geringeren Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen (Hauptkomponente) durch eine Vielzahl statistischer Variablen (Transformation) genähert.

Das Ziel der PCA war es, bei der Interpretation einer Datenmenge durch Bestimmung der Komponenten mit dem größten bzw. kleinsten Einfluss zu helfen. Waren diese Komponenten bekannt, konnte eine kleinere Anzahl von Basisvektoren für die Menge gefunden werden. Dies entsprach einer Dimensionsreduzierung, wodurch nur ein kleiner Teil der in den Daten enthaltenen Informationen verloren ging.

Eine entscheidende Größe der Hauptkomponentenanalyse war die Varianz eines Vektors, welche ein Maß für die Abweichung der Vektorkomponenten zu ihrem arithmetischen Mittel war. Einen ähnlichen Zusammenhang beschrieb auch die Kovarianz, welche zwei Vektoren bezüglich ihrer Varianzen verglich. Die Kovarianz beschrieb also die Unterschiedlichkeit der Abweichung der Vektoren.

Durch die Erweiterung dieser Definition von Vektoren auf Matrizen erhielt man die Kovarianzmatrix, welche quadratisch und symmetrisch war, wodurch die reellen Einträge

## Material und Methoden

diagonalisierbar waren. Ein Maß für die Stärke des linearen Zusammenhanges zweier Messgrößen war der Korrelationskoeffizient.

Die Hauptkomponentenanalyse galt als mathematisches Verfahren, bei dem kein statistisches Modell zur Erklärung der Fehlerstruktur verlangt wurde. Insbesondere wurden keine Annahmen über die Verteilung der Ursprungsvariablen gemacht. Dennoch war die Interpretation der Hauptkomponenten einfacher, wenn eine multivariante Normalverteilung vorausgesetzt werden konnte.

Mit den differentiell regulierten Genen wurde ein hierarchisches Clustern nach Eisen durchgeführt [Eisen MB et al., 1998], d. h. es wurden Gene aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression gruppiert.

Die hierarchische Clusteranalyse war ein distanzbasiertes Verfahren zur Clusteranalyse (Strukturentdeckung in Datenbeständen). Die Cluster bestanden hierbei aus Objekten, die zueinander eine geringere Distanz (oder höhere Ähnlichkeit) aufwiesen als zu den Objekten anderer Cluster. Für dieses distanzbasierte Verfahren gab es unterschiedliche Berechnungsvorschriften (z. B. divisives und agglomeratives Clusterverfahren). Für beide Verfahren galt, dass einmal gebildete Cluster nicht mehr verändert werden konnten. Die Struktur wurde entweder stets nur verfeinert („divisiv“) oder nur vergrößert („agglomerativ“), so dass eine strikte Cluster-Hierarchie entstand. An der entstandenen Hierarchie konnte man nicht mehr erkennen, auf welche Art die Cluster berechnet wurden. Zur Visualisierung der bei einer hierarchischen Clusterung entstehenden Baumstruktur wurde das Dendrogramm genutzt, welches in Form eines Baumes die hierarchische Zerlegung der Datenmenge in immer kleinere Teilmengen darstellte. Jede Kante zwischen einem Knoten und einem seiner Kindknoten hatte als Attribut noch die Distanz zwischen den beiden repräsentierenden Mengen von Objekten.

### Ingenuity Pathway analysis (IPA)

Eine funktionelle Analyse der signifikanten Gene wurde mit IPA durchgeführt. Es wurden die funktionelle Annotation und eine Pathway-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Listen der differentiell exprimierten Gene in Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA, USA; [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) eingelesen. IPA war zugänglich über eine kommerzielle, Web-basierte Oberfläche, die mit einer Vielzahl von Berechnungsalgorithmen zelluläre Netzwerke, Regulatoren, Zusammenhänge, Mechanismen, Funktionen und Wege identifizierte, die statistisch mit den relevanten Veränderungen der Expression in den Genlisten der Experimente zusammenpassten. Die Analyse verwandte

## Material und Methoden

hierzu eine Datenbank von Gen-Interaktionen aus der Literatur, die quartalsweise aktualisiert wurde. Diese Wissensdatenbank organisierte biologische Interaktionen und funktionelle Annotationen von Millionen von individuell erstellten, modellierten Beziehungen und Erkenntnissen. Diese wurden innerhalb dieser Arbeit manuell auf Genauigkeit überprüft. Die Datenbank bot ferner die Verlinkung zu den Originalveröffentlichungen. Ingenuity ermöglichte den Zugriff auf relevante und fundierte Kenntnisse aus Primärliteratur sowie auf öffentliche Datenbanken Dritter, wie zum Beispiel Entrez Gene, RefSeq, OMIM und weitere. Die Analyse- und Suchtools ermöglichten es, die Bedeutung der Daten besser zu erkennen und neue Ziele oder Biomarker-Kandidaten im Rahmen von biologischen Systemen zu entdecken. IPA bot die Möglichkeit, wichtige Regulatoren und Aktivitäten innerhalb von Expressionsmustern festzustellen und zu erklären sowie Vorhersagen über nachgeschaltete Auswirkungen auf biologische und Krankheitsprozesse zu treffen. Die Core-Analyse in IPA identifizierte Beziehungen, Mechanismen, Funktionen und Signalwege, die relevant für ein Daten Set waren.

### Biotique Xray Software-Analyse

Für die Analyse auf alternatives Spleißen wurde die XRAY Version 2.81 verwendet, die als „add-in“ Software in Excel aufgebaut ist und von Biotique Systems Inc. [Burke, J. 2006/2007] vertrieben wurde. Für alle Analysen wurden die Voreinstellungen wie folgt gewählt:

Für die Array-Normalisierung wurde die volle Quantil Normalisierung [Irizarry et al., 2003 (A) und (B)] gewählt, bei der für jeden Array jeder Expressionswert durch einen Prozentwert ersetzt wurde, der sich aus dem Durchschnitt aller Arrays berechnete. Für die Hintergrundkorrektur wurde die GC-basierte „Background Correction“ benutzt. Hier wurden Proben mit einer GC-Anzahl unter 6 und über 17 von der Analyse ausgeschlossen. Der „Probe Score“ wurde dann transformiert, indem der natürliche Logarithmus von 0,1 plus dem jeweiligen „Probe Score“ genutzt wurde. Ferner wurde jeder „Probe Score“ durch die Subtraktion des „Median expression score“ vom Hintergrund korrigiert, indem Hintergrund-„Probes“ mit einem ähnlichen GC-Gehalt genutzt wurden. Expressionswerte und „Probe sets“, die mit weniger als drei „Probes“ belegt waren, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Verlässlichkeit der Exon Array-„Probes“ beruhte auf der Herkunft der genomischen Sequenz, aus der die Sonden hergestellt wurden. Die für die Analyse benutzten „Probe sets“ beinhalteten Sonden-Sets, die ausschließlich „Core probe-sets“ enthielten. Diese Sonden-Sets beruhen auf der Annotierung von genomischen Sequenzen wie RefSeq

## Material und Methoden

(www.ncbi.nlm.nih.gov) oder Ensembl Transkripten (www.ensembl.org). Sonden aus EST und Gen-Vorhersage-Algorithmen wurden ausgeschlossen („full and extended probe-sets“). Nicht exprimierte „Probe sets“ konnten beim Test auf alternatives Spleißen ein falsch positives Ergebnis liefern, da diese im Allgemeinen keine parallele Expression entlang des Gens verursachen. Um diese falsch positiven „Probe sets“ auszuschließen, wurden die nicht exprimierten „Probe sets“ eliminiert. Ein Sondensatz wurde als exprimiert betrachtet, wenn die Expression stärker als die des Hintergrundes war. Der Algorithmus für jede Gruppe besagte Folgendes: Das Integral von T0 wurde auf unendlich der Standardnormalverteilung gesetzt und die Signifikanz als kleiner 0,001 gewählt.

Mit:  $T0 = \text{Sqr}(\text{GroupSize}) (T-P) / \text{Sqr}(\text{Pvar})$

GroupSize = Anzahl der CEL files in der Gruppe

T = Durchschnitt der „Probe scores“ in den „Probe-sets“

P = Durchschnitt der Hintergrundproben mit ähnlichem GC-Gehalt

Pvar = Summe der Varianz der Hintergrundproben / (Anzahl der „Probes“ in „Probe-sets“)<sup>2</sup>

Ferner wurde ein Chi-Quadrat-Test angewendet, um gleichbleibende „Probe-sets“ auszuschließen. Eine „Mixed Model, Nested Analysis of Variance“ nach Montgomery [Montgomery, 2006] wurde angewandt, um Gene mit einer gruppenspezifischen Genexpression oder alternativem Spleißen zu identifizieren. Die so gewonnenen Daten wurden mit der „Analysis of Variance“ (ANOVA) analysiert nach dem linearen Modell:

$$Y[ijk] = M + d[i] + e[j] + c[k(i)] + ed[ij] + ec[jk(i)] + \text{err}[jk(i)]$$

Dabei war M ein globales Mittel, d (i) der Effekt aus der Gruppe i, e (j) die Wirkung von Exon j und ec sowie ed Interaktionseffekte. Der Faktor c stand für die Wirkung der Hybridisierung (c war ein Zufallsfaktor, alle anderen Faktoren waren festgelegt). Dabei war der CEL File-Effekt c innerhalb der Gruppe (d) verschachtelt.

### Korrektur von falsch positiven Genen

Bei der Randomisierung wurde für jedes getestete Gen eine Wahrscheinlichkeit von 0,01 für ein falsch positives Ergebnis angenommen. Dieser Wert war allerdings irreführend, da mit der Anzahl der unabhängig getesteten Gene die Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives wuchs

## Material und Methoden

[Glantz, S., 1996]. Um dies zu korrigieren, wurde das Benjamini und Hochberg „False Discovery“-Verfahren angewendet. Die Methode basierte auf dem Modell von Simes, wobei Benjamini und Hochberg die Prozedur wie folgt beschrieben: Die Gen-Level-p-Werte wurden in aufsteigender Reihenfolge sortiert und korrigiert: Die False Discovery Rate (R) für das Projekt konnte dann durch Entfernen aller Gene, bei denen  $p_{\text{corrected}} > R$  ist, ermittelt werden. Alternativ konnten alle Vorkorrekturen signifikanter Ergebnisse erhalten bleiben und die FDR als die maximale  $p_{\text{corrected}}$  eingestellt werden. Hierbei wurden die einzelnen Tests als unabhängig angenommen. Dieses Verfahren wird bislang als Standard für die Expressionsanalyse betrachtet.

### Bestimmung von „Presence/Absence“

Um die Anwesenheit oder Abwesenheit der Expression eines bestimmten Gens in der Gruppe zu bestimmen, wurde ein p-Wert abgeleitet, um die Nullhypothese zu testen. Hierzu wurde angenommen, dass der Durchschnitt der CEL-Dateien zu einer Gruppe gehörte, die sich nicht vom Hintergrund abhob. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, wenn der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau von 0,01 war, welches dann auftrat, wenn das Gen am wahrscheinlichsten in der Gruppe exprimiert wird. Diese Auswertung wurde wie folgt vorgenommen:

$[1 - \text{Cumulative Standard Normal}(N_0)]$  mit  $N_0 = \text{Sum}(\text{probe} - \text{GC-Hintergrund}) / \text{Var}$

Dabei war Sum die Summe aller Sonden der CEL-Dateien in der Gruppe, GC-Hintergrund der Medianwert bei einem bestimmten Sonden-GC-Gehalt und Var die durchschnittliche Hintergrund-Varianz.

### Filter zur Reduzierung falscher alternativer Spleiß-Annahmen

Große Unterschiede zwischen den Expressionsniveaus in den verschiedenen Gruppen eines Gens konnten durch die Einführung des nicht-linearen Verhaltens resultieren. Diese resultieren aus dem zuvor genannten Modell, da die Annahme falsch positiver Ergebnisse auf alternativem Spleißen beruhte. Solch nicht-paralleles Verhalten konnte als gruppenspezifische alternative Exon-Verwendung registriert werden. Es wurde versucht, diese falsch positiven Ergebnisse durch die Verwendung von p-Werten für die Expression in der Gruppe im Gen zu eliminieren.

Ein Sonderfall tritt ein, wenn nur eine Gruppe exprimiert wurde. Hier wurde für jedes Gen ein p-Wert erzeugt wie für die Anwesenheit von 2 Gruppen (zuvor beschrieben). Es wurden Gruppen aus den CEL-Dateien entfernt, die nicht signifikant über dem Hintergrund exprimiert

## Material und Methoden

waren. Diese Gene, die für das alternative Spleißen von nur einer Gruppe exprimiert wurden, wurden vorerst nicht auf alternatives Spleißen analysiert.

### 3.2.7 TRANSFAC<sup>®</sup> und MATCH<sup>™</sup> Tool

Die am weitesten verbreitete und häufig benutzte Methode für die Erkennung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen war die Anwendung der Position-Gewichtsmatrizen (PWMs positional weight matrices). Die genutzte Datenbank TRANSFAC Professional 10.1 (BIOBASE GmbH, Wolfenbüttel, Germany) war die größte Sammlung von Gewichtsmatrizen für eukaryotische Transkriptionsfaktoren. Für die Sequenzabfrage und Promotoranalyse von Myc-Bindestellen wurde der UCSC Genome Browser verwendet. Dieser wurde genutzt, um die Promotorregionen zu extrahieren. Hierbei wurden exklusiv Promotoren von Genen, die in RefSeq annotiert waren, extrahiert. Der Beginn des ersten Exons, der außerdem die 5'UTR besaß, wurde als vorläufige Transkriptionsstartstelle (TSS) benutzt. Es wurden die Sequenzen 3000 bp stromaufwärts und 100 bp stromabwärts von TSS extrahiert, Letzteres wurde bereits in Reymann und Borlak 2008 beschrieben. Das methodische Vorgehen lehnte an dieser Methode an [Reymann und Borlak 2008 (A) und (B)].

Es wurde ferner der in TRANSFAC integrierte MATCH-Algorithmus verwendet, welcher bei der Berechnung die Frequenz mit dem Informationsvektor multiplizierte. MATCH benutzt für die Berechnung der verschiedenen Transkriptionsfaktor-Bindestellen die Matrix-Bibliothek von TRANSFAC und bot für die Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindestellen die Möglichkeit, die Cutoff-Werte der Matrix-Profile frei einzustellen [Kel AE et al., 2003]. Es wurden das Matrix-Profil „vertebrates\_minSUM\_highQual“ und die Standard-Cutoff-Werte für die Matrix Ähnlichkeit verwendet. Für die Kernähnlichkeit wurden die Cutoff-Werte immer auf 0,75 eingestellt. Der Cutoff für die Matrixähnlichkeit war ein Ergebnis, das die Qualität einer Übereinstimmung zwischen einer Matrix und einem beliebigen Teil der Eingangssequenz beschrieb. Darüber hinaus wurden nur die Übereinstimmungen ausgegeben, die gleich oder höher als der Schwellenwert lagen. Die Anzahl der identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aus dem Datensatz der regulierten Gene/Promotoren wurde mit einem Vergleichspromotorsatz verglichen (Promotoren von 100 ausgewählten Genen, die in keiner der Gruppen reguliert wurden). Die TRANSFAC Release 9.4 und das MATCH<sup>™</sup>-Tool wurden verwendet, um Myc-Bindungsstellen in den regulierten Genen zu suchen. Hierbei wurden die Matrizen M01034, M01145, M01154, M00615, M00322 und M00118 benutzt, die Matrizen bekannter Myc-Bindestellen sind.

## Material und Methoden

### 3.2.8 HMMgene (v.1.1) Analyseprogramm des CBS (Center for Biological Sequence Analysis)

Zur Vorbereitung der Sequenzen für das Programm HMMgene wurde eine Genliste in das BioMart data mining tool von Ensembl geladen [Flicek P.F et al., 2011; Smedley D. et al., 2009; <http://www.ensembl.org/biomart/martview>]. Es wurden als Dataset Ensemble Genes 84 und *Mus musculus* genes ausgewählt. Als Filter wurde die für die Genliste spezifische Input-Referenz (in diesem Fall ENTREZ Gene ID) ausgewählt. Als Attribute wurden für die Sequenz „unspliced“ (Gene) sowie die 3'- und 5'-flankierende Region der Gene im Bereich 3000 bp „upstream“ und 100 bp „downstream“ gewählt. Das Programm gab so die Sequenz im FASTA-Format aus.

Die im FASTA-Format erhaltene Genliste wurde in das Analyseprogramm HMMgene geladen [Krogh A., 1997; <http://www.cbs.dtu.dk/services/HMMgene/>]. Dieses Programm konnte Spleißstellen und Start- und Stopp-Codons vorausberechnen. Es basierte auf dem Hidden Markov model, welches als Wahrscheinlichkeitsverfahren die Genstruktur einbezog. HMMgene konnte auch Genstrukturen mit möglichem alternativem Spleißen erkennen. Als Organismus wurden hierzu „Human (and other vertebrates)“ und als Option „best prediction“ ausgewählt. Ein detaillierteres Analyseverfahren erhielt man, wenn „Predict signals“ ausgewählt wurde, ein Auswahlkriterium, das sich zur Analyse von einzelnen Genen anbot. Das Ergebnis der Analyse wurde auf verschiedene Transkripte durchsucht. Gene, die verschiedene Transkripte aufwiesen, wurden als potentiell alternativ gespleißt angenommen.

### 3.2.9. Panther Gen-Ontologie-Analyse

Die Gen-Ontologie-Analyse wurde mit dem Programm PANTER™ [Version 10; <http://www.pantherdb.org>; Mi H, et al., 2016; Mi H, et al., 2013] durchgeführt. Hierzu wurden die signifikanten Genlisten aller Arrays in das Programm eingeladen. Als Organismus wurde *Mus musculus* ausgewählt, als Analyseform die funktionelle Klassifikation in der Tortendiagramm-Ansicht. Es wurden Gen-Ontologien mit Datenbankannotierungen für die molekulare Funktion und für biologische Prozesse ausgewählt.

## Experimente und Ergebnisse

### 4. Experimente und Ergebnisse

#### 4.1 Transgenes Mausmodell und humane Zelllinie

Es wurde mit einem Aat-myc-transgenen Mausmodell gearbeitet, welches zu einer fortlaufenden HCC-Entwicklung führt. Das Genkonstrukt, das zur Generierung dieser Mäuse benutzt wurde, ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Dieses Tiermodell wurde erstmals von Dalemans [Dalemans et al., 1990] beschrieben. Das Mausmodell bildet die Grundlage aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche. Um die Ergebnisse dieses Mausmodells auf den Menschen zu übertragen, wurden zur Kontrolle der Untersuchungen HepG2-Zellen und Proteinextrakte aus humanem HCC verwendet. Bei der HepG2-Zelllinie handelt es sich um eine 1979 von Aden gewonnene humane Zelllinie [Aden et al., 1979] aus einer Leberbiopsie eines 15 Jahre alten Jungen, welcher an einem primären Hepatoblastom erkrankt war. Diese Zelllinie besitzt noch die meisten typischen Funktionen für normale humane Hepatozyten wie die Sezernierung der meisten Plasmaproteine, zum Beispiel Albumin, Fibrinogen,  $\alpha$ -Fetoprotein, Plasminogen und Apolipoproteine. Ferner besitzt sie auch die Fähigkeiten, Glykogen zu bilden und Collagen I, III und IV [Bouma et al., 1989] zu produzieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Zelllinie ein brauchbares *in vitro*-System zur Wirkstoffforschung sowie bei Fragestellungen bezüglich des Fremdstoffmetabolismus und Toxizitätsuntersuchungen darstellt, da sie über verschiedene Phase-I- und Phase-II-Enzyme des Stoffwechsels normaler menschlicher Leberzellen verfügt und über lange Fortpflanzungsperioden hinweg metabolische Beständigkeit aufweist.

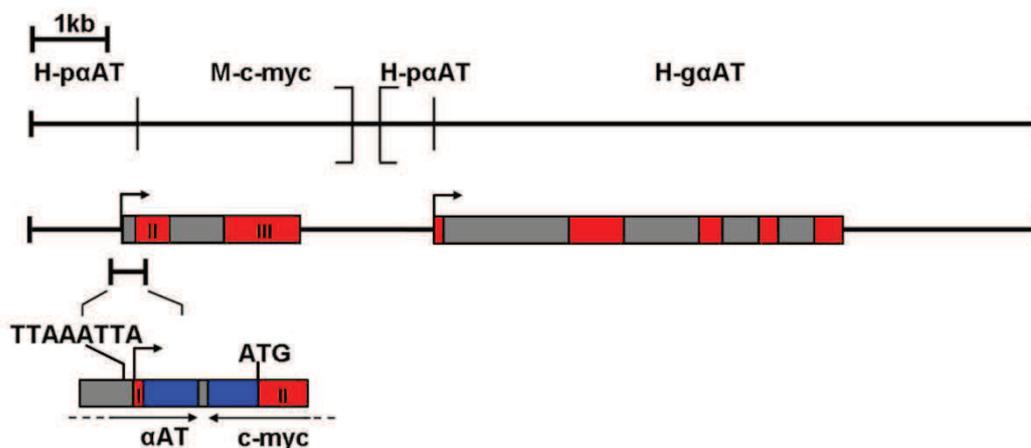


Abb.4.1: Aat-myc-Genkonstrukt, das zur Generierung der transgenen Mauslinie benutzt wurde.

## Experimente und Ergebnisse

### 4.2 Histologie

Die Aat-myc-transgenen Tiere besitzen im Alter von 1,5 Monaten noch keine Knoten. In den Zonen 2 und 3 finden sich großzellig zentral und teilweise auch periportal eine mäßiggradige Hypertrophie der Hepatozyten, sowie hellzellig intermediär Glykogenreichere Hepatozyten (siehe Abb. 4.2 A). Ab einem Alter von 5,5 Monaten finden sich in der zuvor beschriebenen zonalen Läppchen Gliederung zwei bis drei großzellig überwiegend nur zentral sowie hellzellig intermediär und periportal vorkommende Hepatozyten (siehe Abb. 4.2 B). Daneben sind erste dysplastische Herde und Knoten (DF/DN) zu erkennen, die teilweise unscharf begrenzt und meist kleinzellig sind (siehe Pfeil). Ferner sind vereinzelt hellzellig und mittelgroßzellig dysplastische Knoten und fragliche initiale HCCs zu erkennen. Die karzinomatöse Transformation scheint bei etwa einem Durchmesser von 0,6 mm bis 1,0 mm zu beginnen. Die Kriterien hierfür sind die vorwiegend großzelligen, vergrößerten und hyperchromatischeren Kerne mit einem relativ scharfen Rand (siehe Abb. 4.2 C). In sieben bis acht Monate alten Tieren ist noch eine zonale Läppchen Gliederung zu erkennen. Es finden sich vermehrte DF/DN mit variabler Zytologie. Bereits relativ zahlreiche initiale und auch kleine bis mittelgroße HCCs sind zu beobachten. Die größten HCCs liegen bei 5,0 bis 6,0 mm im Durchmesser und sind meist großzellig, teilweise auch hellzellig, mit verstärkter Kernatypie. Diese sind durch hyperchromatische und teilweise vesikuläre Kerne mit häufig prominenten Nucleolen zu erkennen. Es können regional die zunehmend prominenteren großzelligen und hellzelligen Zonen scheinbar knotig imponieren. Des Weiteren fällt eine zunehmend ausgeprägte diffuse Hyperplasie und Hypertrophie (LCD/ *liver cell dysplasia*) auf. Die DF/DN werden nicht selten unscharf begrenzt und sind vom Restparenchym schlecht abgrenzbar. In elf bis zwölf Monate alten Tieren ist noch eine gewisse zonale Gliederung des hyperplastischen Restparenchyms erhalten. Diese verwaschen durch diffuse, aber auch jetzt noch zentral betonte LCD sowie vermehrte, zumeist unscharf begrenzte DF/DN mit variabler Zytologie, die kleinzellig, hellzellig und/oder großzellig auftreten. Darüber hinaus liegen große HCCs vor, die offensichtlich aus Konglomeraten verschiedener Primärherde entstanden sind (Kollisionstumoren, siehe Abb. 4.2 D). Die HCCs erscheinen überwiegend hochdifferenziert bis mittelgradig differenziert, wobei die Hepatozyten dabei überwiegend großzellig, aber auch mittelgroßzellig und kombiniert hellzellig vorliegen. Fokal sind die HCCs schlechter differenziert mit verstärkter Kernatypie, welche dann die Hyperchromasie mit häufig grobgranulärem Chromatin und teilweise vesikulären Kernen mit prominenten Nucleolen betont. Es ist eine verstärkte Kerngrößenvariation (Anisokaryose) zu erkennen. Die

## Experimente und Ergebnisse

kleinen und großen HCCs sind überwiegend scharf und rundlich bis polyzyklisch begrenzt bei partiell expansivem Wachstum (pushing margin). Es ist auch destruierendes, invasives Wachstum ersichtlich. Die unregelmäßigen Tumortrabekel sind tendenziell radiär orientiert. In den LCD, DF/DN und HCCs sind vermehrte Mitosen, Apoptosen und auch einige polymorphe oder mehrkernige Riesenzellen zu erkennen.

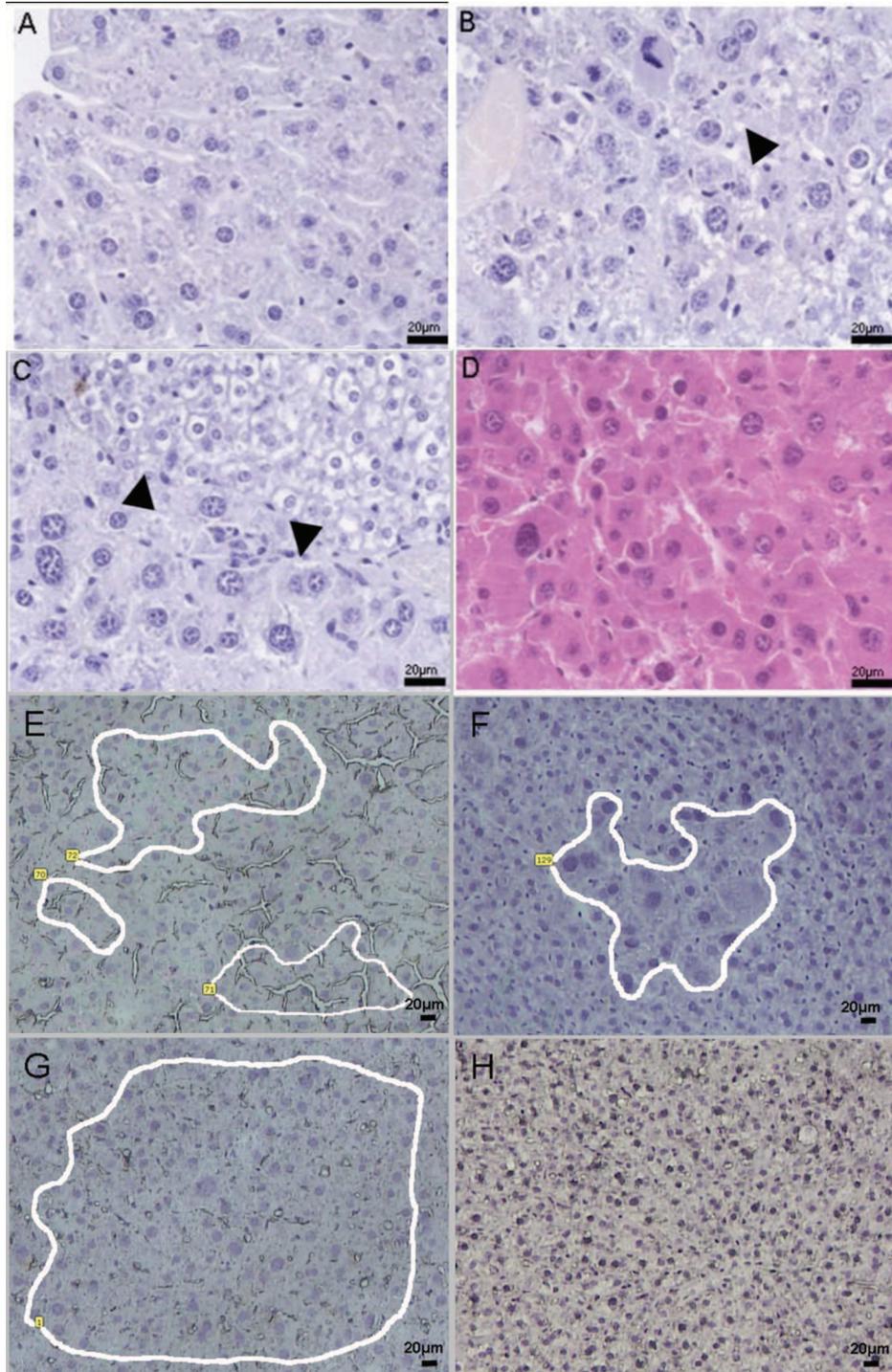


Abbildung 4.2: Leberschnitte (D) in H&E-Färbung, alle weiteren in Hämatoxylin-Färbung. In den Abb. E-H sind gesundes Lebergewebe (E), dysplastische Vorläuferläsionen (F), HCC (G) und nicht-transgenes (H) Lebergewebe der Mikrodissektion zu erkennen.

## Experimente und Ergebnisse

### 4.3 Microarray-Experimente

Die Microarray-Biochips bestehen aus einem Trägermaterial, auf dem synthetische Nukleinsäuren bekannter Sequenz in hoher Anzahl und Dichte definiert fixiert sind. In einem Microarray-Experiment binden fragmentierte und markierte cRNS-Proben an die komplementären Oligonukleotidsequenzen auf dem Chip. An der markierten cRNS bindet ein Farbstoff, der mittels Laserlicht angeregt wird. Diese Fluoreszenzintensitäten werden durch Einscannen gemessen, in Graustufenbilder konvertiert und als numerische Intensitätswerte gespeichert. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Biochips handelt es sich um den GeneChip® Murine Genome U74v2 (3'IVT Arrays) und den GeneChip® Mouse Exon 1.0 ST Array (Affymetrix). Der Murine Genome U74v2 Chip ermöglicht die Analyse des Mausgenoms mit den auf sich befindlichen 36.000 full-length Genen und EST Clustern. Der Mouse Exon 1.0 ST Array ermöglicht neben der Genomanalyse auch eine Transkriptomanalyse mit 1,2 Millionen Probe Sets und rund einer Million Exon Clustern. Der wesentliche Unterschied der beiden Arrays besteht in der Lokalisation der Probe Sets, die bei dem Murine Genome U74v2 Chip am 3'-Ende und beim Exon Array über den gesamten mRNA-Bereich des Gens verteilt liegen.

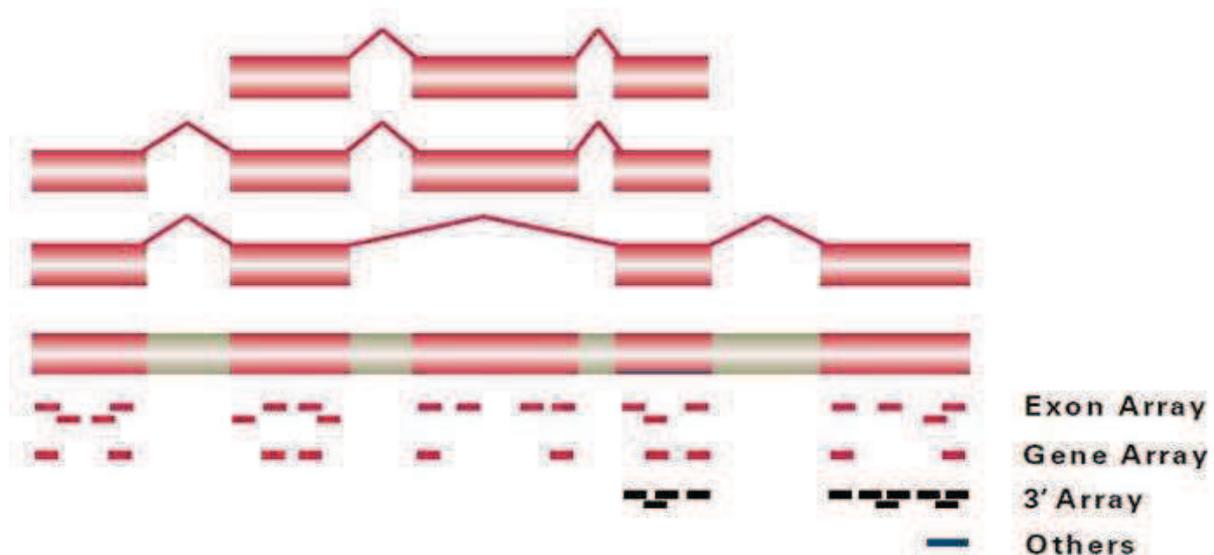


Abb. 4.3: Darstellung der verschiedenen Arraytypen von Affymetrix.

#### 4.3.1 3'IVT Arrays

Die 3'IVT Microarray-Intensitätsinformationen stammen aus der Diplomarbeit von Katrin Hoffmeyer, welche als Grundlage für die weiteren Analysen und zum Vergleich der Exon

## Experimente und Ergebnisse

Array-Daten herangezogen wurde. Die aus diesen Versuchen gesammelten Intensitätsinformationen wurden in dieser Arbeit mit den aktuellen Software-Versionen von Array Track statistisch ausgewertet und analysiert. Es wurde eine SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), eine PCA (*Principal component analysis*) und eine HCA (*hierarchical gene cluster analysis*) durchgeführt.

### 4.3.2 Exon Array

#### Qualitätskontrolle

Um die Qualität der Exon Arrays zu sichern, wurden verschiedene Qualitätskontrollen durchgeführt. Hierzu gehört eine optische Qualitätskontrolle der Graustufenbilder auf Artefakte. Dabei konnten keine Artefakte festgestellt werden. Um die Intensitätsinformationen eines Probe Sets zu bestimmen, wurde die Expression Console™ Software benutzt und die *Probe Logarithmic Intensity Error estimation* (PLIER) angewendet.

Des Weiteren wurde eine erweiterte Qualitätskontrolle der Chips mit der Expression Console™ durchgeführt (*Quality control report tool*).

	Threshold Test	pm mean	bgnd mean	pos vs neg auc	bac spike rle mean	neg control rle mean	polya spike rle mean	pos control rle mean
▶ AatMyc_70.2D_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	158.949158	223.239334	0.906916	0.049710	0.416592	0.357373	0.272162
AatMyc_70.2K_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	124.120087	182.543350	0.910701	0.260540	0.481936	0.272883	0.296376
AatMyc_70.2T_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	162.732635	210.905029	0.912913	0.279641	0.408299	0.234712	0.313982
AatMyc_73.0D_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	199.823151	248.921555	0.917450	0.223494	0.380748	0.251366	0.294594
AatMyc_73.0K_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	175.081146	217.661270	0.913921	0.156116	0.428895	0.114506	0.309098
AatMyc_73.0T_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	130.217361	187.101456	0.915824	0.335111	0.471062	0.191989	0.287649
AatMyc_76.4Knt_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	153.052017	235.416809	0.909316	0.049772	0.409904	0.275586	0.286978
AatMyc_76.5Knt_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	166.786179	266.628052	0.905285	0.055973	0.394799	0.228978	0.271752
AatMyc_78.4D_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	124.625793	176.005844	0.892259	0.320474	0.437275	0.098796	0.333983
AatMyc_78.4K_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	175.943985	258.169403	0.908674	0.118604	0.393448	0.196266	0.254852
AatMyc_78.4T_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	193.026810	280.728449	0.910052	0.171703	0.373159	0.115505	0.242609
AatMyc_79.0Knt_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	229.124802	416.522827	0.895727	0.211636	0.440709	0.351636	0.380275
AatMyc_79.1Knt_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	157.081833	215.578583	0.909524	0.084974	0.400102	0.286797	0.276718
AatMyc_79.2Knt_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	212.234802	288.469635	0.909334	0.525939	0.387250	0.157932	0.310607
AatMyc_80.0D_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	203.895370	297.979156	0.910090	0.045716	0.402706	0.181166	0.254783
AatMyc_80.0K_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	148.349411	233.363922	0.907829	0.177937	0.456238	0.121227	0.256523
AatMyc_80.0T_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	155.001526	273.426566	0.913346	0.356252	0.423200	0.097972	0.277092
AatMyc_84.2D_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	166.966263	247.418289	0.909779	0.057370	0.369670	0.138554	0.239487
AatMyc_84.2K_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	146.449844	219.931778	0.911664	0.101956	0.438942	0.100070	0.263669
AatMyc_84.2T_[MoEx-1_0-st-v1].Danele_Exon.ma-gene-extended	NA	133.693680	239.507294	0.906031	0.320227	0.453878	0.342416	0.325156

Abb. 4.3.2 A: „Background“-Qualitätskontrolle mit der „Expression Console“

## Experimente und Ergebnisse

Der Report zeigt, dass für die Probe „79.0 Kontrolle“ ein deutlich höherer Background als bei den anderen Proben vorliegt.

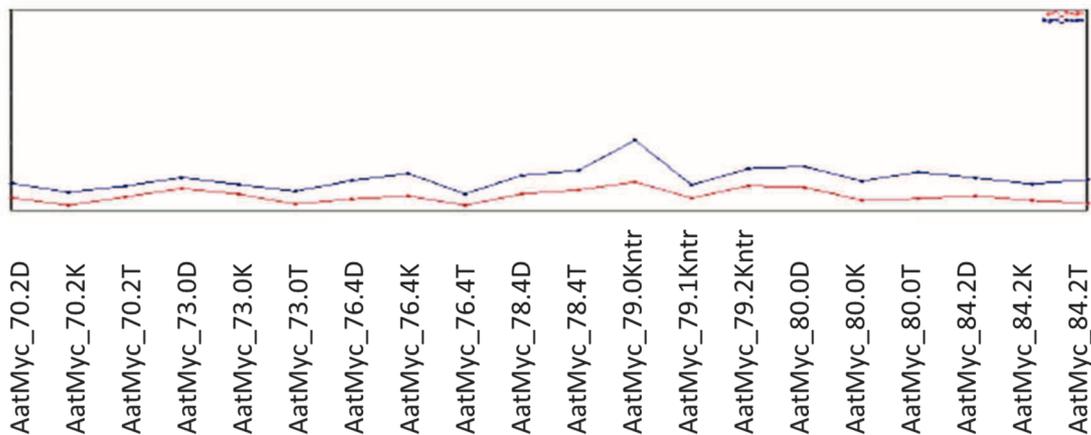


Abb. 4.3.2 B: Vergleich von „Background“ und „pm mean“

Dies zeigt sich auch bei dem Vergleich von *Background* (blau) und *pm mean* (rot) (siehe Abb.4.3.2.B). Laut Hersteller sollten beide einen nahezu gleichen Verlauf aufweisen, was bei Probe „79.0 Kontrolle“ nicht der Fall ist.

Auch die weiteren Qualitätskontrollen zur Hybridisierung und zum Labeling zeigen annähernd gleiche Werte, mit Ausnahme des Vergleiches der Poly-A-Spike-In-Kontrolle. Hier ist keine Auftrennung bei der Probe „79.0 Kontrolle“ möglich (siehe Abb.4.3.2.C).

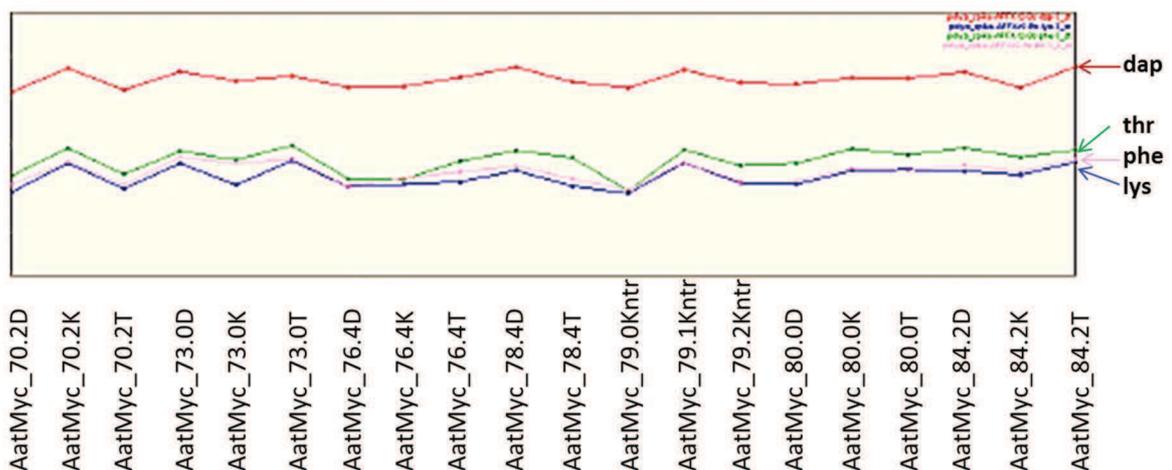


Abb. 4.3.2 C: Qualitätskontrolle: Vergleich der Hybridisierung (Poly-A-Spike-In-Kontrolle)

Der Vergleich der pos vs neg AUC zeigt, dass alle Proben einen Wert von über 0,8 haben. Vom Hersteller werden Werte zwischen 0,8 und 1 als erstrebenswert angesehen. Ein Wert von unter 0,7 ist vom Hersteller als Ausschlusskriterium gesetzt.

## Experimente und Ergebnisse

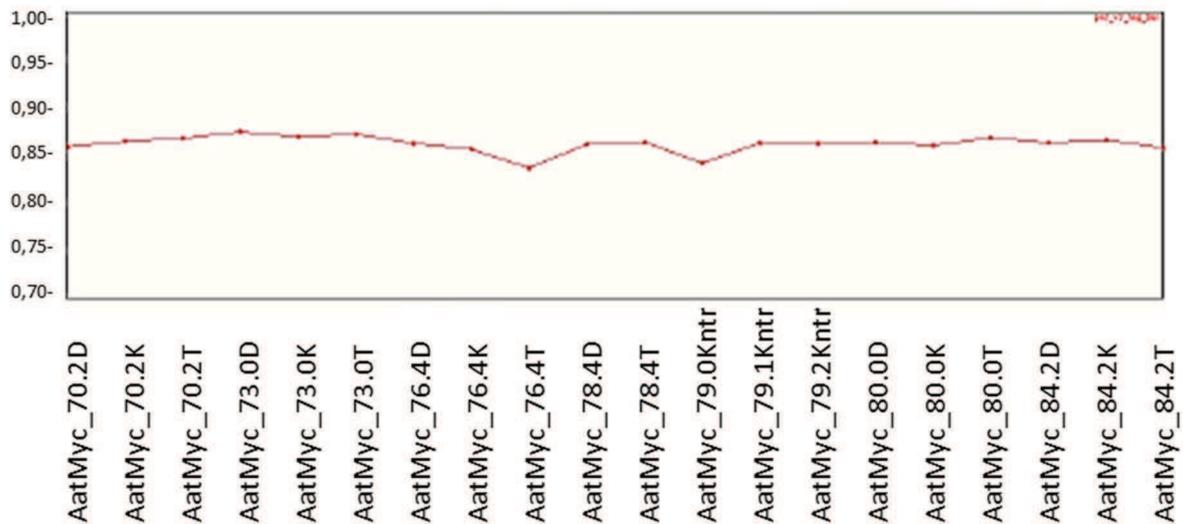


Abb. 4.3.2 D: Qualitätskontrolle zum Vergleich der pos vs neg AUC

Weiterhin wurden Qualitätskontrollen zur Beurteilung der Signal-Verteilung durchgeführt. Der Vergleich der Signalintensitäten der einzelnen Proben zeigt, dass die Streuung für die Probe „79.0 Kontrolle“ am stärksten ist.

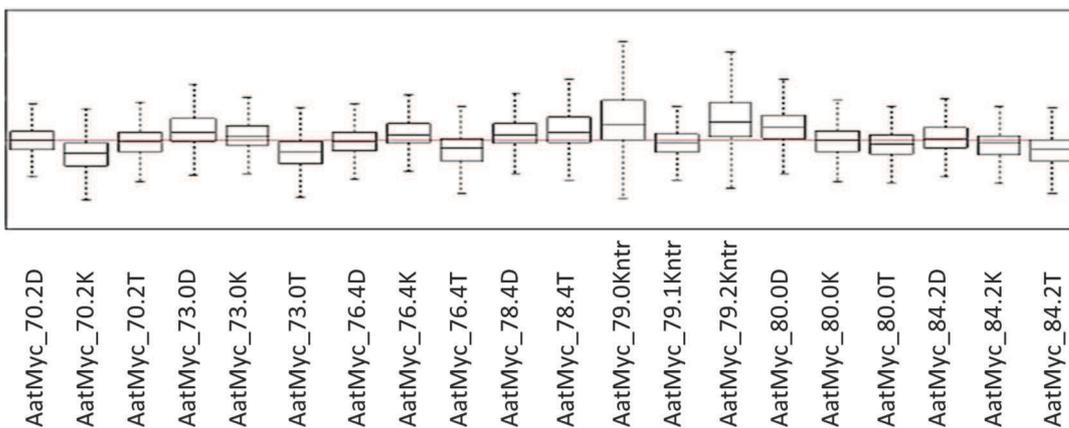


Abb. 4.3.2 E: Diagramm zum Vergleich der *relative log Probe Cell Intensity* (Probe Intensität vor der Normalisierung)

## Experimente und Ergebnisse

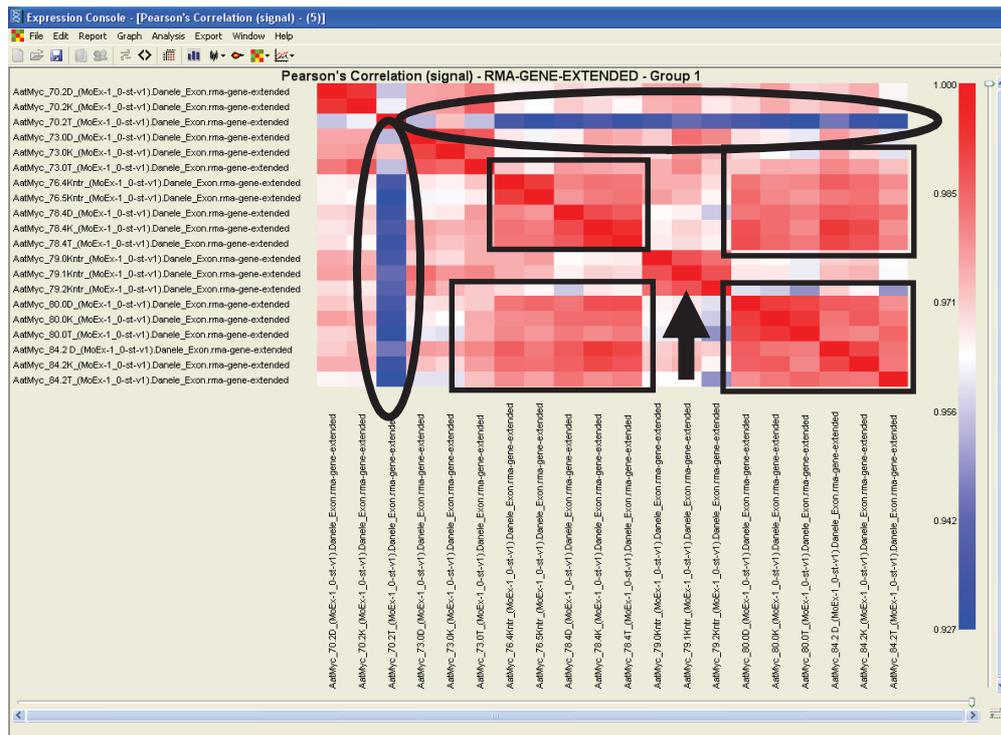


Abb. 4.3.2 F: „Pearson’s Correlation“-Qualitätskontrolle

Bei der Pearson’s Correlation der Daten fällt auf, dass die Probe „70.2 Tumor“ mit einem Korrelationskoeffizienten von kleiner als 0,94 (blau, mit Kreis markiert) sich deutlich von den übrigen Proben unterscheidet, weshalb diese Tumor-Probe als Ausreißer in Bezug zur Kontrolle und Dysplasie desselben Tieres und in Bezug zu den anderen Tieren anzusehen ist. Die Proben der Tiere 76.4, 76.5, 78.4, 80.0 und 84.2 stehen in hoher Korrelation zueinander, was einer Übereinstimmung von 97 bis 99 % entspricht und weshalb folglich ein Unterschied von 1 bis 3 % aufgrund unterschiedlicher Genexpression vorliegt (rot, mit Kasten markiert). Die nicht-transgenen Kontrollen (mit Pfeil markiert) stehen in hoher Korrelation zueinander und trennen sich von den transgenen Tieren ab.

## Experimente und Ergebnisse

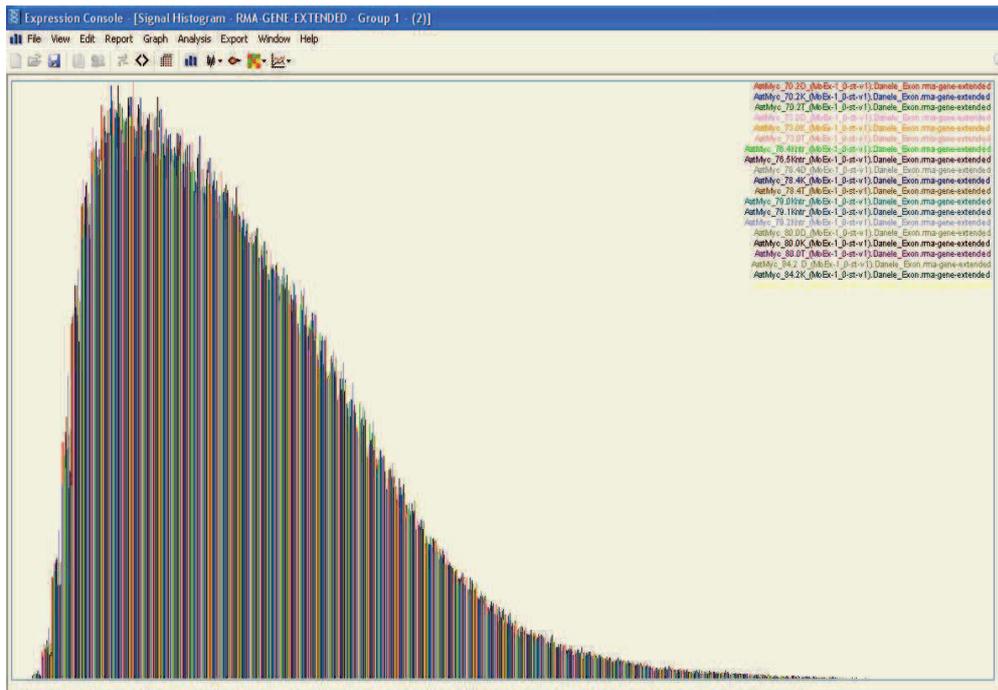


Abb. 4.3.2 G: Histogramm zur Qualitätskontrolle der Signalintensitäten

Die Kontrolle der Signalintensitäten zeigt, dass die Intensitäten zwar recht gering sind, es aber keine Ausreißer gibt.

Die Qualitätskontrollen der Expression Console™ konnten für keine der Proben die vom Hersteller angegebenen Ausschlusskriterien feststellen. Die qualitative Analyse der Microarrays zeigt allerdings, dass die Probe „79.0 Kontrolle“ als Grenzfall aufgrund abweichender Rohdaten und die Probe „70.2 Tumor“ als ein biologischer Grenzfall anzusehen ist. Die weiteren Ergebnisse dieser Proben werden daher besonders kritisch betrachtet.

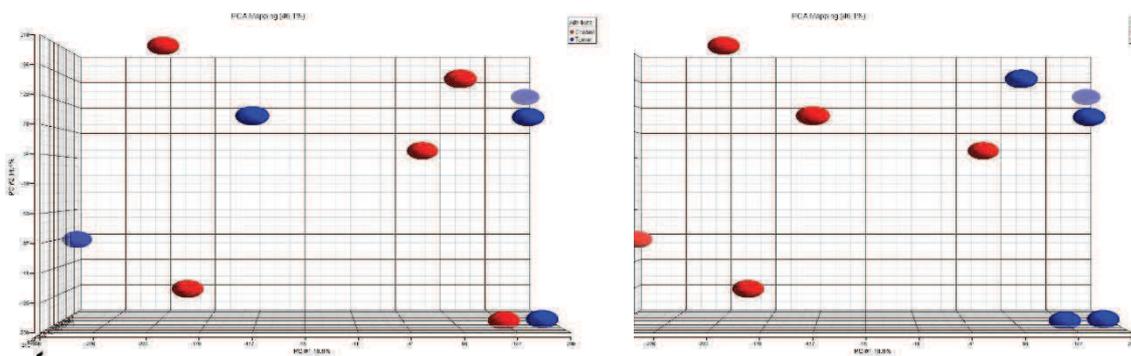


Abb. 4.3.2 H und I: (H) PCA zur Auftrennung von Kontrolle (rot) und Tumor (blau); (I) PCA zur Auftrennung nach Scan-Datum (rot=10.06.09, blau=11.06.09)

Eine PCA-Auftrennung am Beispiel von zwei untersuchten Gruppen (linkes Bild: rot=Kontrolle, blau=Tumor) ohne Filter zeigt, dass diese sich nicht nach Entität, sondern nach

## Experimente und Ergebnisse

Scan-Datum (rechtes Bild: rot=10.06.09, blau=11.06.09) auftrennen. Dies bedeutet, dass methodische Unterschiede innerhalb der Probenaufbereitung vorliegen.

### 4.3.3 Array Track-Software und XRAY Biotique

Die Array Track-Software wurde zur statistischen Auswertung der Mikroarrays herangezogen. Es wurden eine SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), eine PCA (*Principal component analysis*) und eine HCA (*hierarchical gene cluster analysis*) durchgeführt. Die Xray (Excel® Array Analysis) Software (Biotique Systems) ermöglicht die statistische Auswertung von Microarray-Experimenten, wobei neben Genen mit einer veränderten Genexpression auch Gene mit alternativem Spleißen identifiziert werden können.

#### SAM (Significance Analysis of Microarrays)

Die SAM-Analyse zeigte bei dem Vergleich zwischen nicht-transgenem und transgenem Lebergewebe zwei Monate alter Tiere 72 signifikant regulierte Gene. Hiervon waren 47 Gene hoch- und 25 herunterreguliert. Ein Vergleich zwischen sechs Monate alten Tieren und nicht-transgenen Tieren wies 88 signifikant regulierte Gene auf, und der Vergleich zwischen zwölf Monate alten Tieren mit HCC und nicht-transgenen Tieren zeigte 524 signifikant regulierte Gene. In sechs Monate alten Tieren waren 42 Gene hoch- und 46 Gene herunterreguliert. Im HCC der zwölf Monate alten Tiere waren 299 Gene induziert und 225 Gene reprimiert. Wie anhand des Venn-Diagramms ersichtlich ist, haben die unterschiedlichen Altersstufen elf gemeinsam regulierte Gene. Die zwei und sechs Monate alten Tiere weisen 23 gemeinsam regulierte Gene, die zwei und zwölf Monate alten Tiere 25 und die sechs und zwölf Monate alten Tiere 27 gemeinsam regulierte Gene auf. Die SAM-Analyse weist bei dem Vergleich der Exon Array-Daten zwischen nicht-transgenem und gesundem Lebergewebe 1179 signifikant regulierte Gene auf. Hiervon konnten 136 Gene in Array Track annotiert werden. Ein Vergleich zwischen dysplastischem Gewebe und nicht-transgenem Lebergewebe wies 925 signifikant regulierte Gene und signifikant alternativen Exon-Gebrauch auf (103 Gene sind annotiert). Der Vergleich zwischen Tumorgewebe und nicht-transgenem Gewebe zeigte 824 signifikant regulierte Gene und mögliche Spleiß-Events (davon sind 112 Gene annotiert). Wie anhand des Venn-Diagramms ersichtlich ist, haben die unterschiedlichen histologischen Befunde 146 gemeinsam regulierte Gene (15 annotiert). Das gesunde Gewebe und das dysplastische Gewebe weisen 228 gemeinsam regulierte Gene (24 annotiert), das gesunde und

## Experimente und Ergebnisse

tumoröse 326 (27 annotiert) und das dysplastische und tumoröse 247 gemeinsam regulierte Gene (20 annotiert) auf.

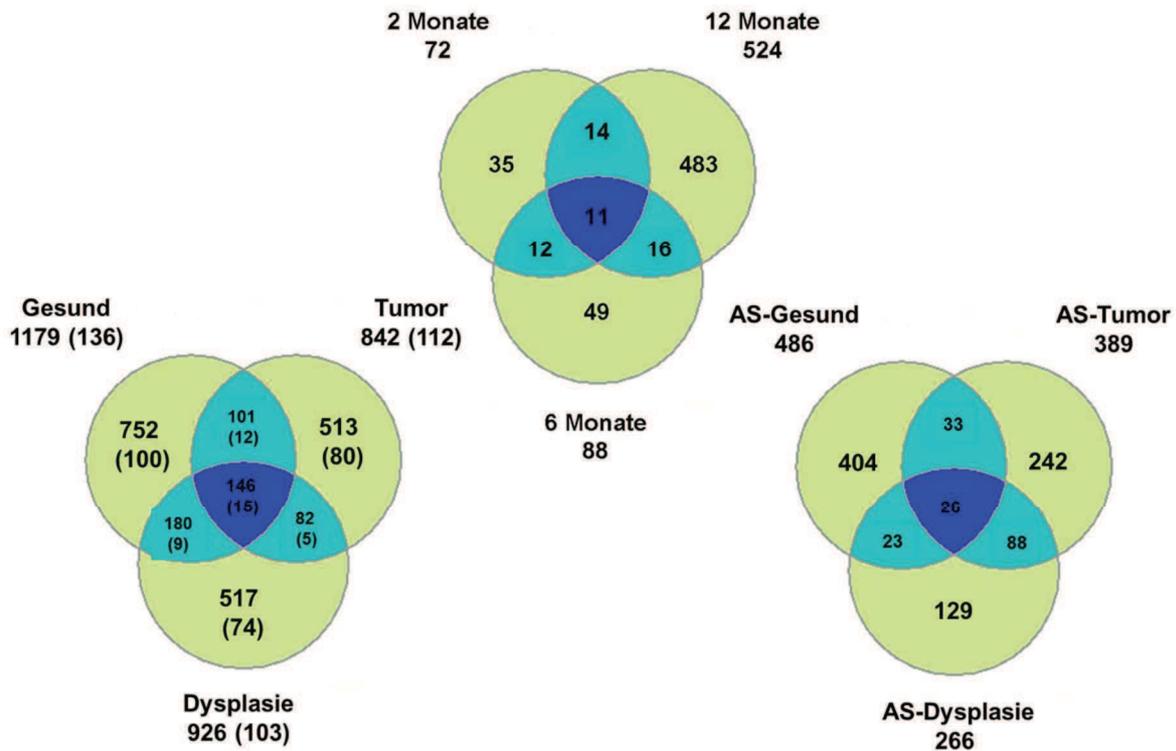


Abb. 4.3.3 A: Venn-Diagramme zu allen durchgeführten Microarrays

Das Venn-Diagramm zu den signifikant alternativen Spleiß Varianten (Analyse mit Biotique) weist 486 signifikante Spleiß-Events im Vergleich zwischen gesundem und nicht-transgenem Gewebe auf sowie 266 Spleiß-Events in dysplastischem und 389 in tumorösem Gewebe. Hiervon haben alle histologischen Befunde 26 gemeinsame Spleiß-Events. Das gesunde Gewebe besitzt 23 gemeinsame Spleiß Varianten mit dem dysplastischen Gewebe und 33 gemeinsame Spleiß Varianten mit dem tumorösen Gewebe.

Von den 720 signifikant regulierten Genen in gesundem, aber transgenem Gewebe sind 506 Gene hoch- und 214 Gene herunterreguliert. In dem dysplastischen Gewebe sind 334 Gene induziert und 197 Gene reprimiert. In tumorösem Gewebe konnten eine induzierte Genregulation für 235 Gene und eine Repression für 203 Gene festgestellt werden.

### Exon Arrays

Die Array Track-Software wurde zur statistischen Auswertung der Microarrays herangezogen. Es wurde eine SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), eine PCA

## Experimente und Ergebnisse

(Principal component analysis) und eine HCA (hierarchical gene cluster analysis) durchgeführt.

In der PCA und HCA aller Exon Array-Daten ist eine eindeutige Abtrennung der nicht-transgenen Tiere (blau) zu den transgenen Tieren festzustellen. In dieser Analyse trennen sich die Gruppen Kontrollgewebe (grün) und Dysplasie (gelb) nicht ab. Die Tumorproben zeigen eine eindeutige Abtrennung in der PCA, welche aber nicht in der HCA deutlich wird.

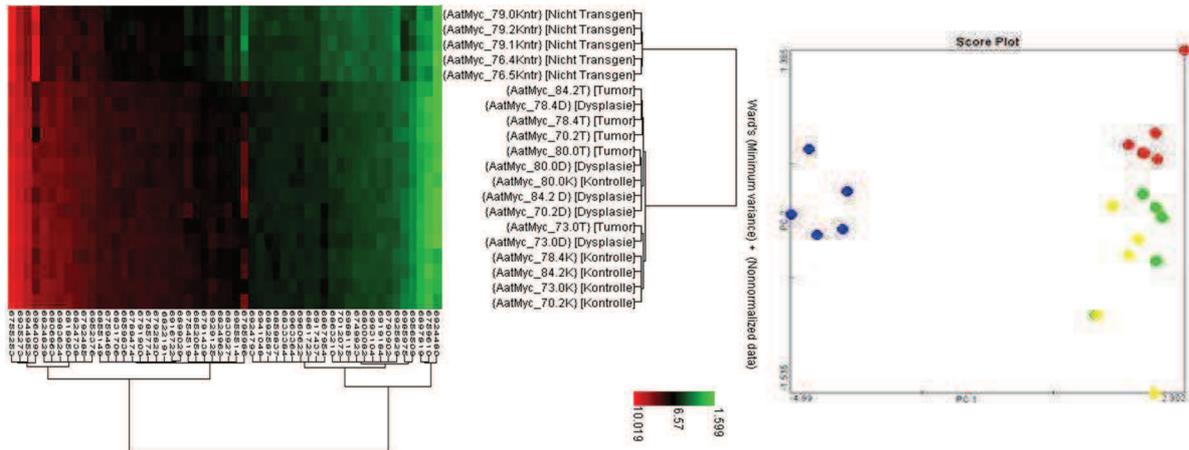


Abb. 4.3.3 B: HCA und PCA aller Exon Array-Daten

Die HCA und PCA der normalisierten Werte trennen sich eindeutig ab.

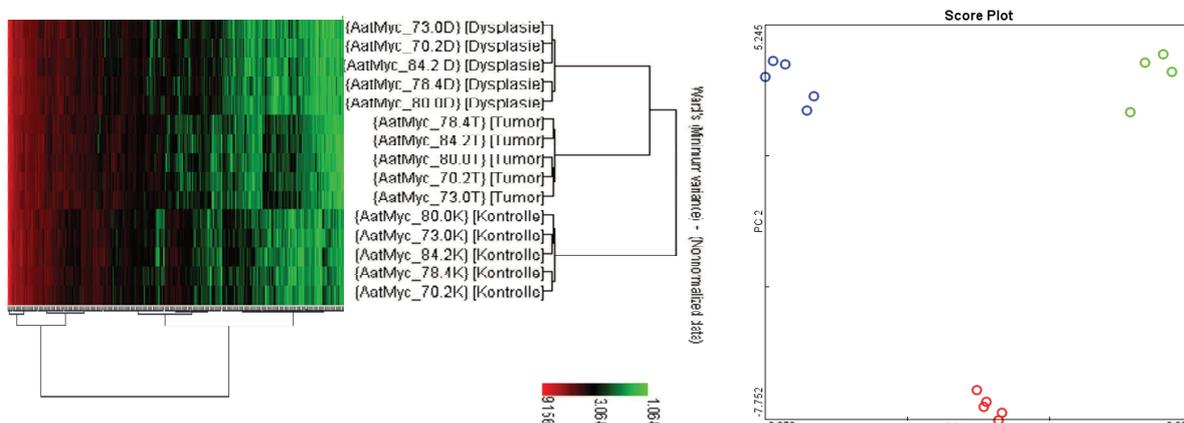


Abb. 4.3.3 C: HCA und PCA der normalisierten Exon Array-Daten

Auch die HCAs und PCAs (hier nicht abgebildet) für die verschiedenen Gewebe trennen sich eindeutig, wie beim Vergleich der einzelnen Gruppen festzustellen ist.

## Experimente und Ergebnisse

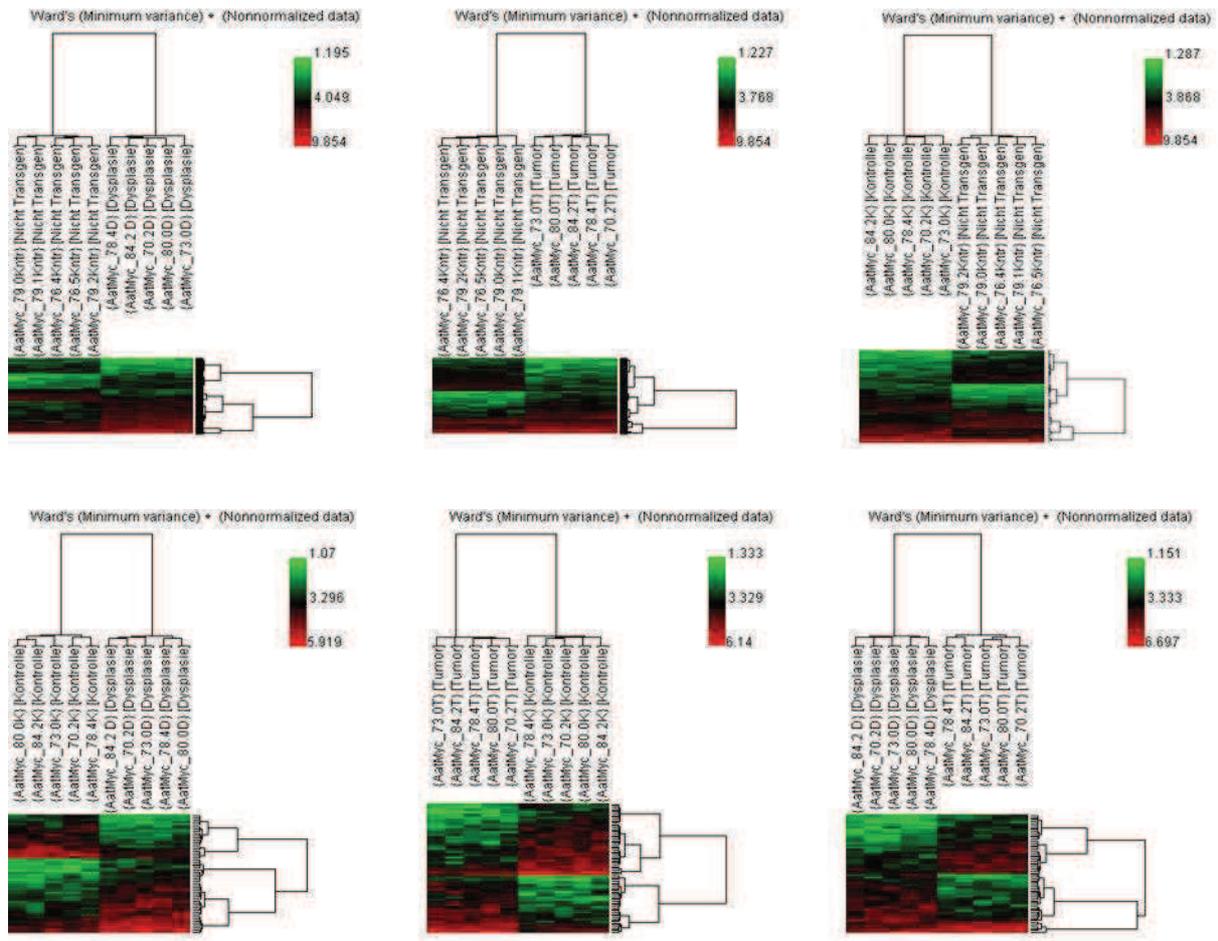


Abb. 4.3.3 D: HCA der einzelnen Exon Array-Gruppen zur nicht-transgenen Kontrolle (oben) sowie im Einzelvergleich zueinander (unten)

Während für die bisherigen HCAs und PCAs lediglich die Genexpressionsdaten verglichen wurden, stellen für das folgende HCA die Spleiß Varianten die Datengrundlage.

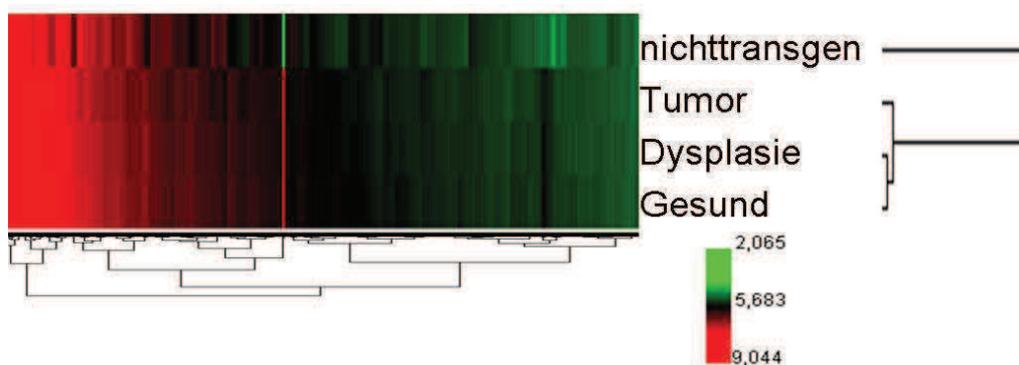


Abb. 4.3.3 E: HCA aller Exon Array-Daten mit alternativem Spleiß-Event

## Experimente und Ergebnisse

Wie anhand der HCA ersichtlich ist, trennen sich alle Gruppen voneinander ab, wobei die Trennung zwischen nicht-transgenen und transgenen Proben schärfer ist. Die Distanz zwischen Dysplasie und Kontrollgewebe ist kleiner als die Distanz zum Tumorgewebe.

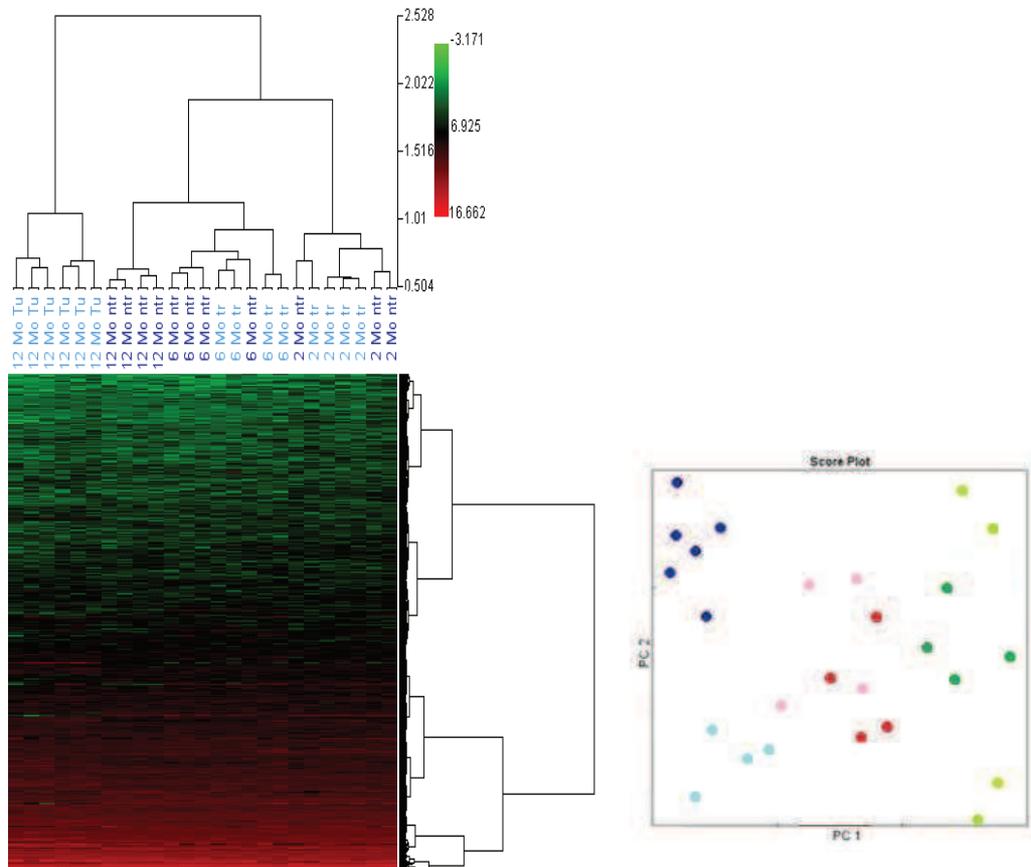


Abb. 4.3.3 F: HCA und PCA des Gesamtdatensatzes aus der Arbeit von Katrin Hoffmann (12 Monate blau; 6 Monate rot, 2 Monate grün; nicht-transgene Tiere wurden heller dargestellt)

In der HCA und PCA der 3'IVT Array-Daten ist mit Ausnahme der zwölf Monate alten Tiere (blau und hellblau) mit Tumor keine eindeutige Abtrennung der nicht-transgenen Tiere zu den transgenen Tieren festzustellen. Die verschiedenen Altersstufen lassen sich in der HCA und PCA abtrennen.

### Analyse auf alternatives Spleißen

Die Analyse auf alternativen Exon-Gebrauch, der mittels der Xray (Excel® Array Analysis) Software (Biotique Systems) statistisch errechnet wurde, ergab eine hohe Anzahl an Genen, in denen ein Spleiß-Event zu vermuten ist. Die Biotique-Analyse auf alternative Spleiß-Events ergab 486 alternative Events für das gesunde transgene Gewebe, 266 Events für dysplastisches Gewebe und 389 Events für Tumorgewebe. Jedes dieser Gene wurde detailliert

## Experimente und Ergebnisse

auf unterschiedlichen Exon-Gebrauch untersucht. Dies erfolgte einerseits über die visuelle Kontrolle im Biotique-Programm. Am Beispiel des MYB binding protein (P160) 1a sind die Unterschiede der einzelnen Probe Sets zwischen nicht-transgenem und dysplastischem Lebergewebe zu sehen. In den Abbildungen weiß hinterlegt sind mögliche Spleiß-Events. Ferner ist anhand der Abbildung zu sehen, dass die Expression der einzelnen Probe Sets zwischen den verschiedenen Proben variiert. Neben dem Gen *Mybbp1a* konnten auch die Gene *Ankfy1*, *Arnt2*, *Btbd1*, *Cad*, *Chmp1a*, *Dock7*, *Eef1a1*, *Gata4*, *Itrp2*, *St6gal1*, *Stat1*, *Tfdp1*, *Txlna* und *Ugt1a6a* mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein alternatives Spleiß-Event identifiziert werden.

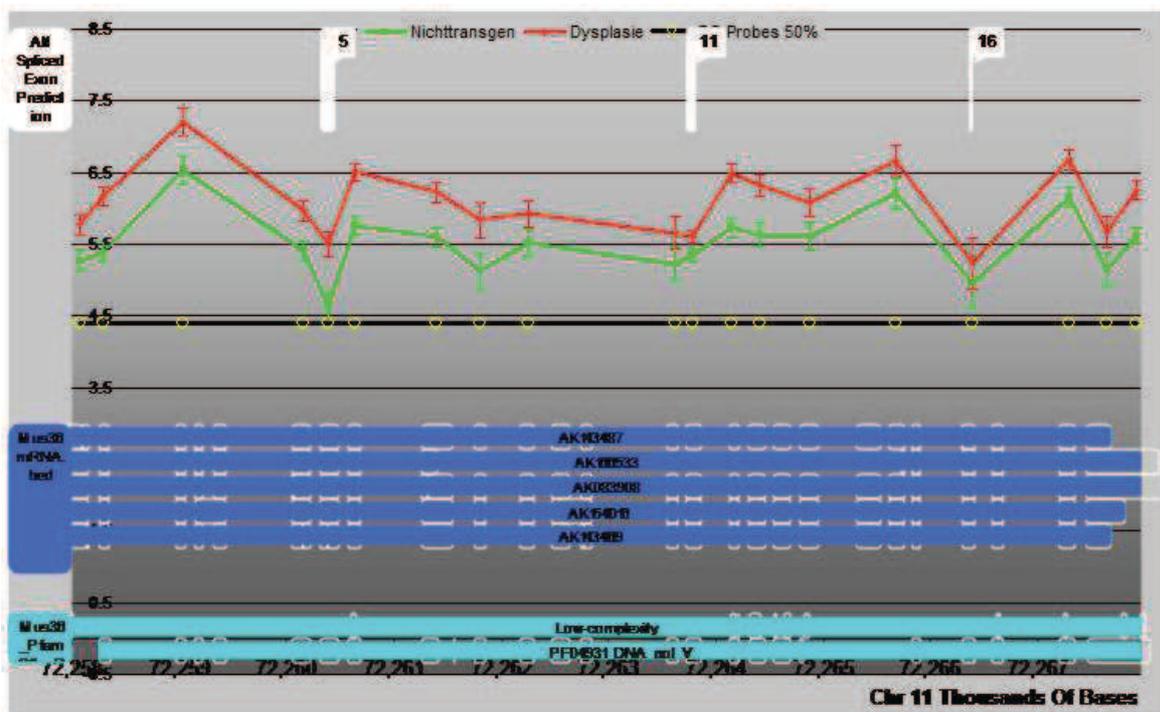
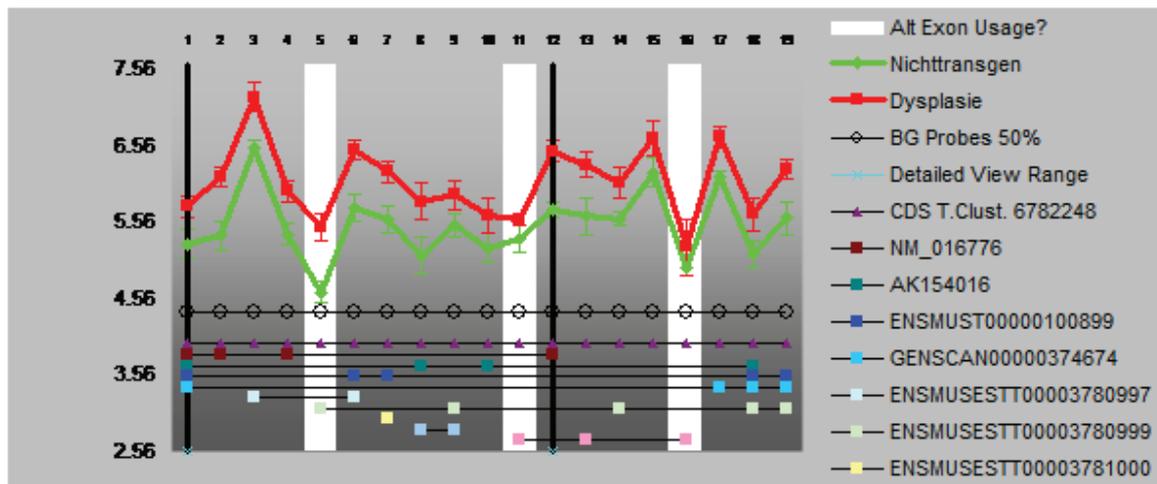


Abb.4.3.3 G1 und 2: Visuelle Kontrolle der alternativen Spleiß-Events mit dem Biotique-Programm am Beispiel von *Mybbp1a*

## Experimente und Ergebnisse

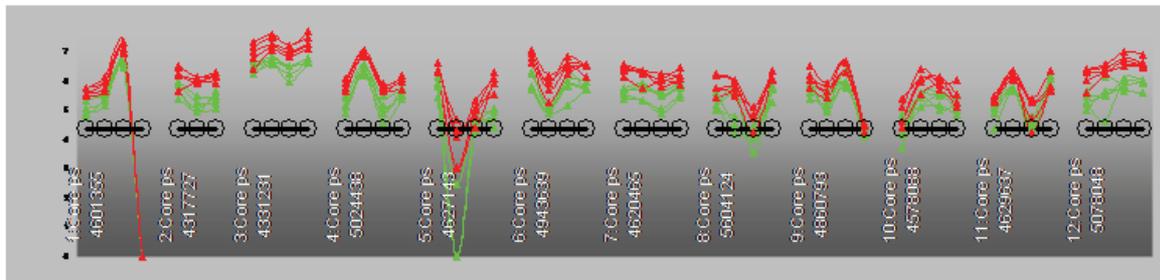


Abb.4.3.3 G3: Visuelle Kontrolle der alternativen Spleiß-Events mit dem Biotique-Programm am Beispiel von Mybbp1a

Als weitere Kontrolle wurden die Expressionswerte der Gene herangezogen, wobei Cad, Dock7, Eef1a1, Iptr2, Mybbp1a, Tfdp1 und Txlna über eine signifikante Genexpression verfügen. Des Weiteren wurden die Literaturdaten zu den Genen genutzt. Gene, die in der Literatur bereits als alternativ gespleißt identifiziert wurden, sind Ankfy, Btbd1, Cad, Dock7, Iptr2, Stat1 und Ugt1a6a. Darüber hinaus wurde das Gen Aukb als Kontrollgen herangezogen, da es laut Literatur im HCC und bei Lebererkrankungen alternativ gespleißt wurde [Tanaka et al., 2008; Yasen et al., 2009 und Berasain et al., 2010]. Zusätzlich wurde eine computergestützte Analyse der Gensequenzen durchgeführt. Hierzu wurde eine Genliste mit einer Auswahl an Genen (signifikante Genexpression und signifikanter alternativer Exon-Gebrauch oder Signifikanz aufgrund visueller Kontrolle) in das BioMart data mining tool von Ensembl eingeladen [Flicek et al., 2011; <http://www.ensembl.org/>]. Dieses Programm gibt die Gene aus der Genliste im FASTA-Format wieder. Ferner besteht die Möglichkeit, auch die 3'- und 5'-flankierende Region der Gene im FASTA-Format darzustellen. Für die Transkriptionsfaktor Bindestellen wurde der Bereich 3000bp upstream und 100bp downstream des Transkriptionsstartes analysiert. Analog hierzu wurde auch diese Region für das alternative Spleißen ausgewählt. Im Anschluss wurde die Genliste im FASTA-Format in das Analyse-Programm HMMgene eingeladen (Ergebnisse siehe Anhang 1) [Krogh et al., 1997; <http://www.cbs.dtu.dk/services/HMMgene/>]. Dieses Programm kann Spleiß Stellen und Start- und Stopp-Codons vorausberechnen. Das Programm basiert auf dem hidden Markov model, welches ein Wahrscheinlichkeitsverfahren auf der Genstruktur ist. Das Programm HMMgene kann auch Genstrukturen mit möglichem alternativem Spleißen erkennen. Die Region 100bp downstream zeigte für kein Gen eine Voraussage, die auf alternatives Spleißen schließen ließ. In der Region 3000bp upstream wurde für die Gene Ipo4, Dock7, Rxrb, Ugt1a6a und Chmp1a eine mögliche alternative Spleiß Variante vorhergesagt. Für die ungespleißten Gensequenzen wurden mögliche alternative Spleiß-Events in den Genen Gata6,

## Experimente und Ergebnisse

Ipo4, Ankfy1, Btbd1, Dync1h1, Tdrd3, Stard3, Gata4, Arnt2, Dock7, Zbtb7b, Zfp106, Itpr2, Ar, Smad3, Ncor3, Ugt1a6a und St6gal1 vorausberechnet.

### 4.3.4 PCR-Analyse auf alternatives Spleißen

Für die PCR-Analyse auf alternatives Spleißen wurden folgende Gene ausgesucht: Mybbp1a, Ankfy1, Arnt2, Aukb, Btbd1, Cad, Chmp1a, Dock7, Eef1a1, Gata4, Itpr2, St6gal1, Stat1, Tfdp1, Txlna und Ugt1a6a. Diese Gene wurden aufgrund einer hohen Wahrscheinlichkeit für ein alternatives Spleiß-Event ausgewählt, welches sich in den zuvor genannten Analysen gezeigt hatte. Zur Analyse in der PCR wurden Primer Paare designt, die das Exon mit dem alternativen Spleiß-Event überspannen. Die PCR wurde mit dem Light Cycler (Roche) durchgeführt, so dass bereits kleine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebeproben (nicht-transgenes Gewebe, Kontrollgewebe, Dysplasie und Tumor) sichtbar wurden.

Im Anschluss an die qRT-PCR wurden die Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Größere Unterschiede in den Fragmentlängen der Amplifikate konnten auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Die Aufreinigung der Fragmente aus dem Gel sowie eine erneute Amplifikation in der PCR zur anschließenden Sequenzierung wurden durchgeführt.

#### Spleiß-Event

Die Sequenzierung der Gene Arnt2 und Btbd1 lässt auf ein Spleiß-Event schließen. So konnte für Btbd1 lediglich ein Amplifikat im dysplastischen Gewebe identifiziert werden. Für das Kontrollgewebe und das Tumorgewebe konnten zwar Amplifikate in der PCR und im Agarosegel eluiert werden, diese entsprachen aber in der Sequenzierung nicht dem Gen Btbd1, so dass anzunehmen ist, dass im Kontrollgewebe und im Tumorgewebe eine andere Spleiß Variante des Gens Btbd1 aktiv ist. Für das Gen Arnt2 konnte in der Sequenzierung des ersten Primer Paares lediglich ein Amplifikat für das Tumorgewebe als Arnt2 identifiziert werden und für das zweite Primer Paar ein Amplifikat für das dysplastische Gewebe. Dies deutet auf zwei unterschiedliche Spleiß Varianten im dysplastischen Gewebe und Tumorgewebe hin. Alle weiteren Sequenzierungen ergaben keine Unterschiede im Hinblick auf alternativen Exon-Gebrauch.

## Experimente und Ergebnisse

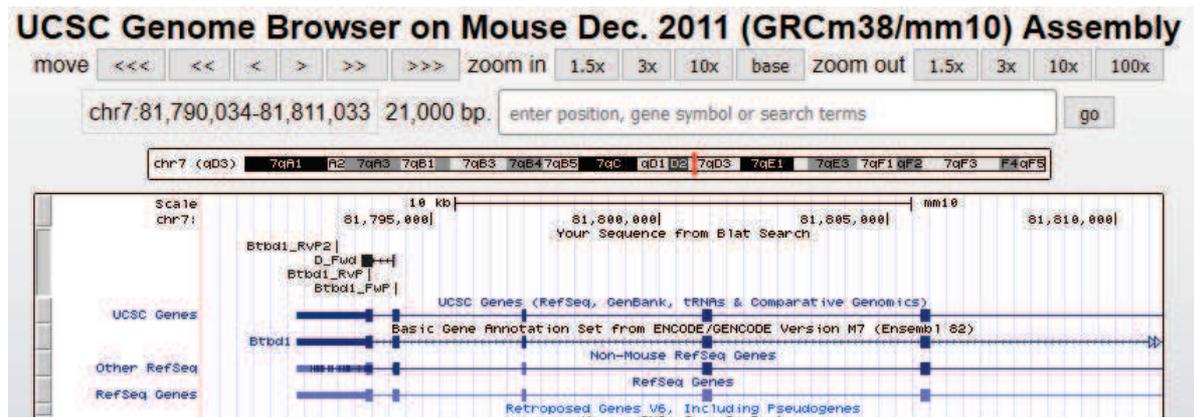


Abb. 4.3.4 A: UCSC-Analyse-Ausschnitt aller für Btd1 erhaltenen Sequenzen inklusive Primer

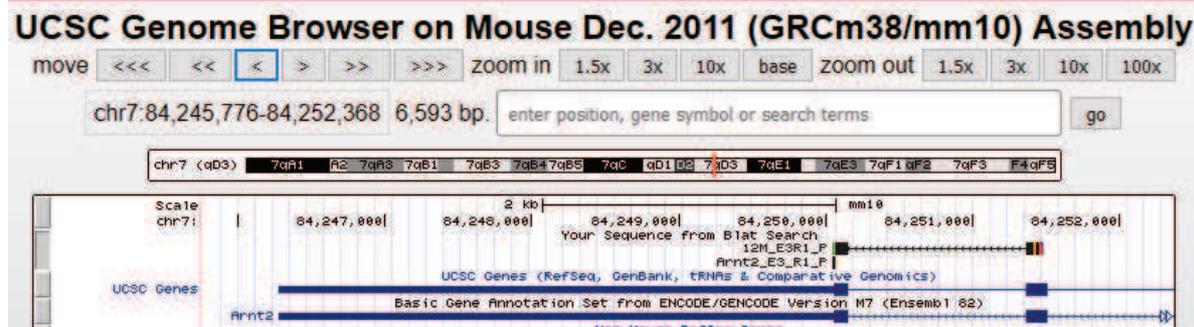
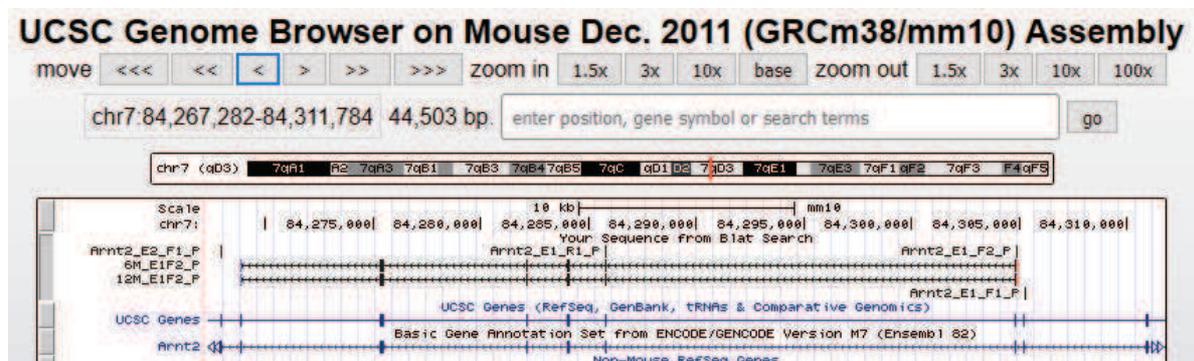


Abb. 4.3.4 B und C: UCSC-Analyse-Ausschnitte aller für Arnt2 erhaltenen Sequenzen inklusive Primer

### 4.3.5 Gen Ontologie (GO)-Analyse

Für die Analyse der Gen Ontologie wurden die signifikanten Genlisten aller Arrays in PANTER™ [Version 10; <http://www.pantherdb.org>; Huaiyu et al., 2013 und Huaiyu et al., 2016] eingeladen. Es wurden die signifikanten Genlisten der zwei, sechs und zwölf Monate alten Tiere, die signifikanten Genlisten des Kontrollgewebes, Dysplasie- und Tumorgewebes analysiert, ebenso die Genlisten mit signifikant unterschiedlichem Exon-Gebrauch der zuvor

## Experimente und Ergebnisse

genannten Gewebearten. Als Spezies wurde *Mus musculus* gewählt und als Analyseform die funktionelle Klassifikation in der Tortendiagramm-Ansicht. Es wurden Gen Ontologien mit Datenbankannotierungen für die molekulare Funktion (das Programm beinhaltet 9942 Angaben) und für biologische Prozesse (das Programm beinhaltet 27852 Angaben) erstellt. Hierbei wurden folgende Diagramme erstellt:

### Molekulare Funktion:

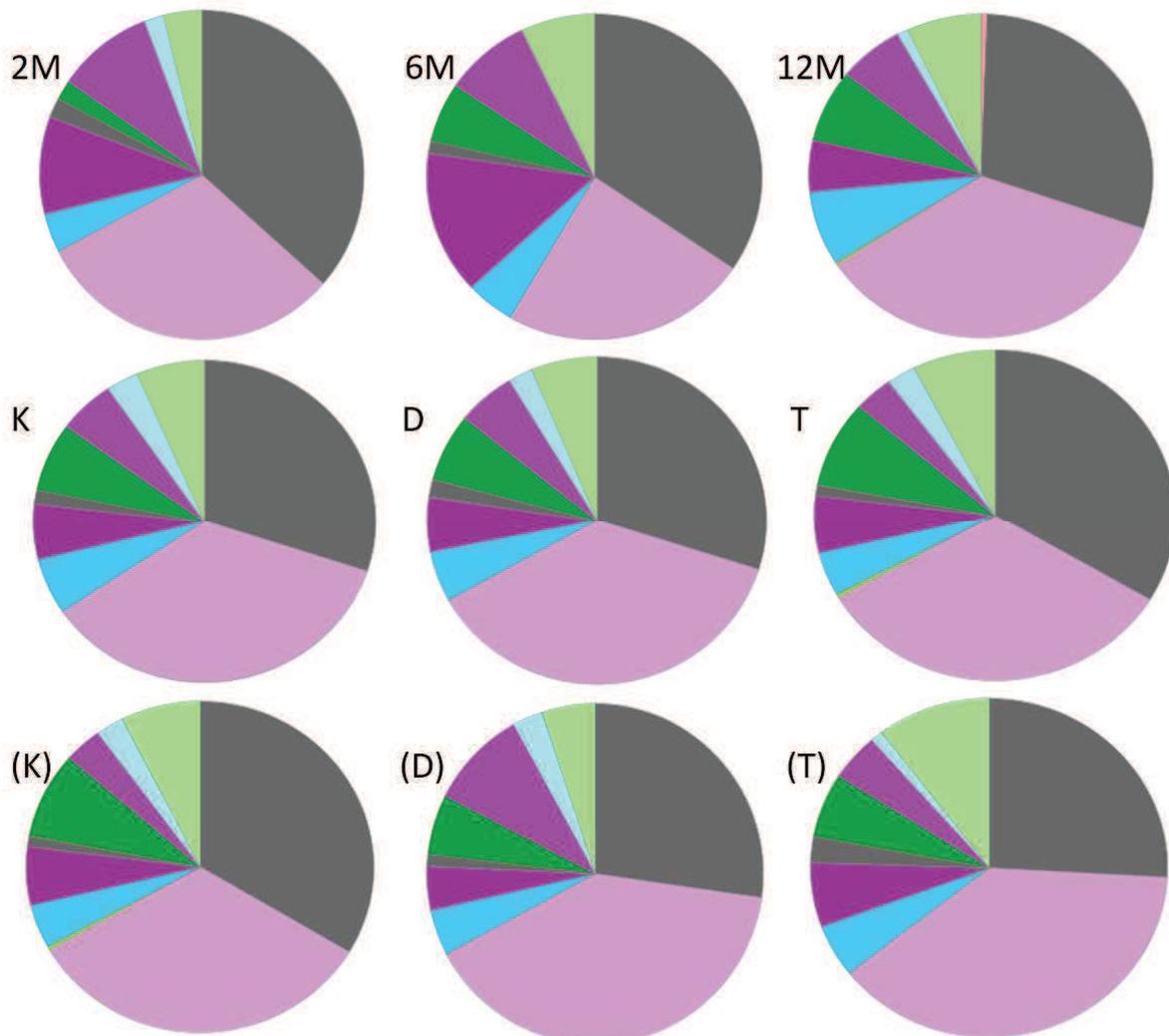


Abb. 4.3.5 A: Gen Ontologie-Diagramm der molekularen Funktionen der regulierten Gene von 2, 6 und 12 Monate alten transgenen Tieren sowie der Krankheitsbilder Kontroll-, Dysplasie- und Tumorgewebe der transgenen Tiere. (K, D, T) sind die Gene mit alternativem Exon-Gebrauch. (Legende siehe Abb. 4.3.5.C auf der nächsten Seite)

## Experimente und Ergebnisse

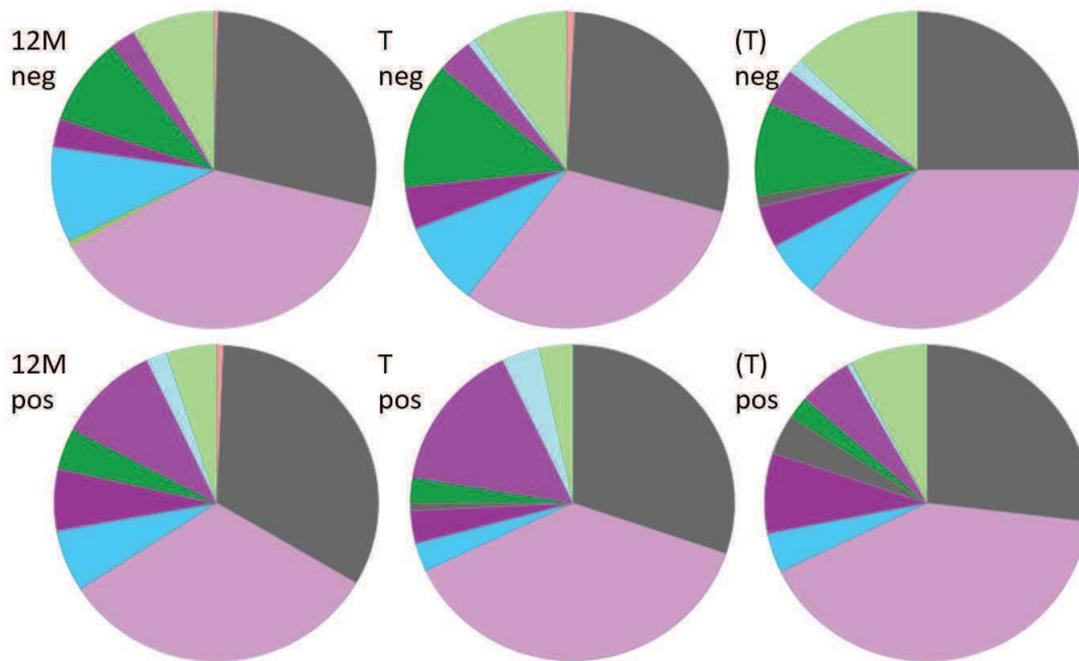


Abb. 4.3.5 B: Gen Ontologie-Diagramm der molekularen Funktionen der regulierten Gene von 12 Monate alten transgenen Tieren sowie Tumorgewebe der transgenen Tiere. T bezeichnet hierbei die signifikant regulierten Gene und (T) den alternativen Exon-Gebrauch, wobei in neg (negativ) und pos (positiv) regulierte Gene unterschieden wurde.

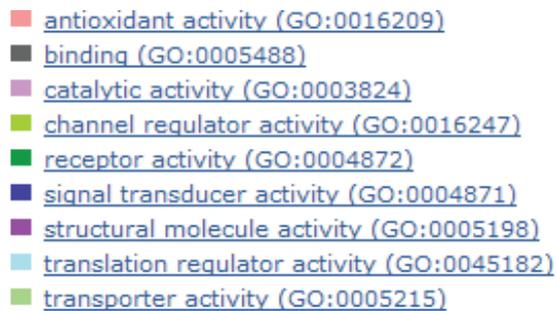


Abb. 4.3.5 C: Legende zu den Gen Ontologie-Diagrammen der molekularen Funktionen

## Experimente und Ergebnisse

### Biologische Prozesse:

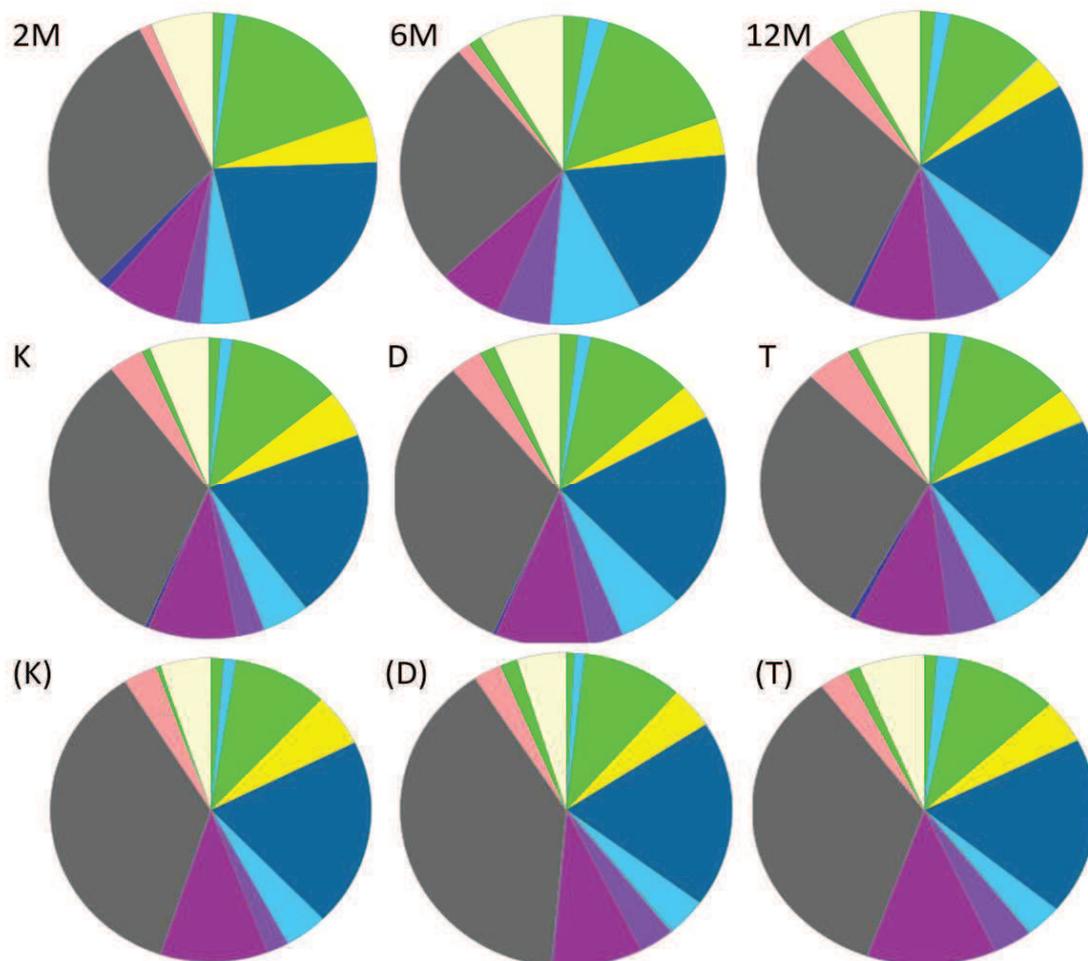


Abb. 4.3.5 D: Gen Ontologie-Diagramm der biologischen Prozesse der regulierten Gene von 2, 6, und 12 Monate alten transgenen Tieren sowie der Krankheitsbilder Kontroll-, Dysplasie- und Tumorgewebe der transgenen Tiere. (K, D, T) sind die Gene mit alternativem Exon-Gebrauch.

- [biological adhesion \(GO:0022610\)](#)
- [biological regulation \(GO:0065007\)](#)
- [cell killing \(GO:0001906\)](#)
- [cellular component organization or biogenesis \(GO:0071840\)](#)
- [cellular process \(GO:0009987\)](#)
- [developmental process \(GO:0032502\)](#)
- [growth \(GO:0040007\)](#)
- [immune system process \(GO:0002376\)](#)
- [localization \(GO:0051179\)](#)
- [locomotion \(GO:0040011\)](#)
- [metabolic process \(GO:0008152\)](#)
- [multicellular organismal process \(GO:0032501\)](#)
- [reproduction \(GO:0000003\)](#)
- [response to stimulus \(GO:0050896\)](#)
- [rhythmic process \(GO:0048511\)](#)

Abb. 4.3.5 E: Legende zu den Gen Ontologie-Diagrammen der biologischen Prozesse

## Experimente und Ergebnisse

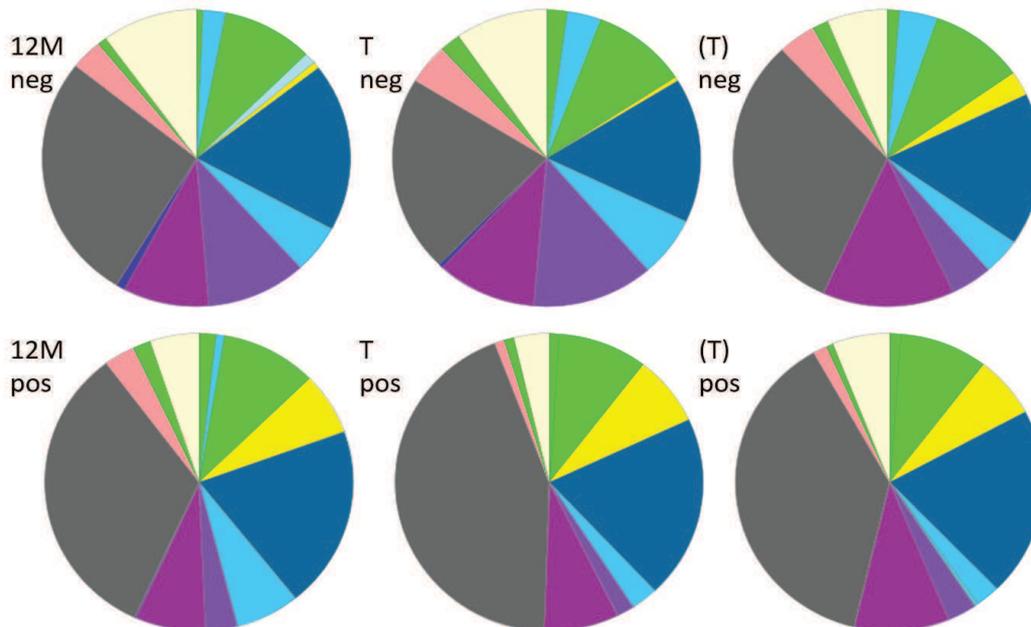


Abb. 4.3.5 F: Gen Ontologie-Diagramm der biologischen Prozesse der regulierten Gene von 12 Monate alten transgenen Tieren sowie Tumorgewebe der transgenen Tiere. T bezeichnet hierbei die signifikant regulierten Gene und (T) den alternativen Exon-Gebrauch, wobei in neg (negativ) und pos (positiv) regulierte Gene unterschieden wurde. (Legende siehe Abb. 4.3.5.E auf der vorherigen Seite)

### 4.3.6 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

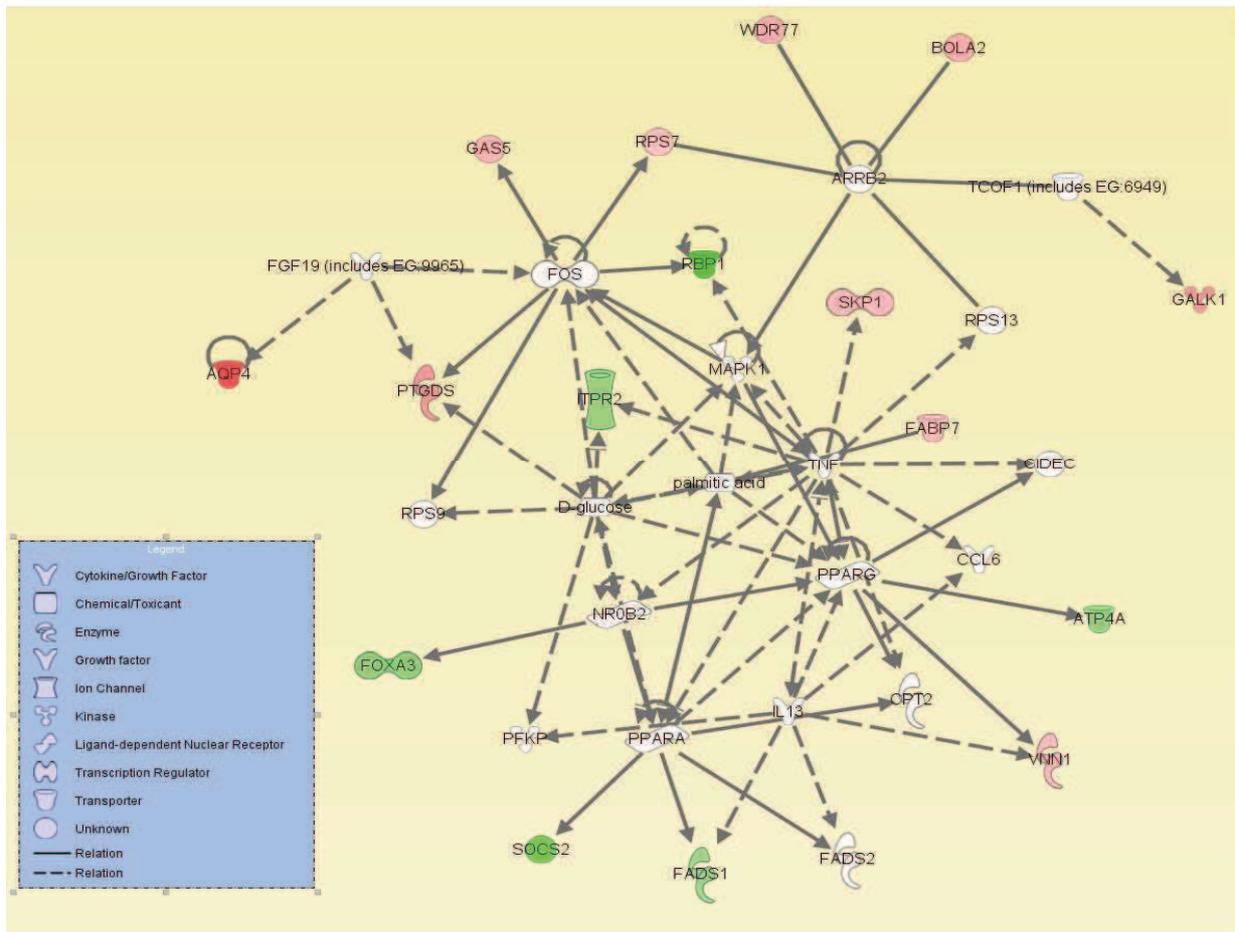
IPA ist eine Software, die experimentelle Datensätze zum Beispiel aus Microarray-Experimenten analysiert und hinsichtlich biologischer Prozesse, Signalwegen und Netzwerken interpretiert. Des Weiteren filtert die Software die Datensätze nach Kandidaten für potentielle Biomarker. Im Folgenden sind jeweils die drei Top-Netzwerke der verschiedenen Untersuchungsgruppen dargestellt. Die Netzwerke werden von der Ingenuity Software als Zusammenschluss verschiedener bekannter Netzwerke aufgebaut. Deren Bezeichnung ist ebenfalls ein Zusammenschluss und wird in der deutschen Übersetzung verwendet. Bei der Erstellung der Netzwerke werden alle bekannten Verbindungen der Netzwerke miteinander verknüpft, die regulierte Gene aufweisen. Die Netzwerke beinhalten Proteine und Proteinkomplexe. Da die dargestellte Regulation auf der Genregulation aus den Mikroarray-Daten beruht, wird im Weiteren von regulierten Genen gesprochen, die einheitlich in Großbuchstaben wiedergegeben werden.

Die aufgrund einer veränderten Genexpression festgestellten Top-Netzwerke in zwei Monate alten Aat-Myc-transgenen Mäusen sind 1: Lipidmetabolismus, molekularer Transport und

## Experimente und Ergebnisse

Biochemie kleiner Moleküle; 2: Krebs, Proteinsynthese und zelluläre Bewegung; 3: Zellzyklus, Entwicklung und Funktion des Haares und der Haut und Stoffwechselkrankheiten.

Path Designer Network 1



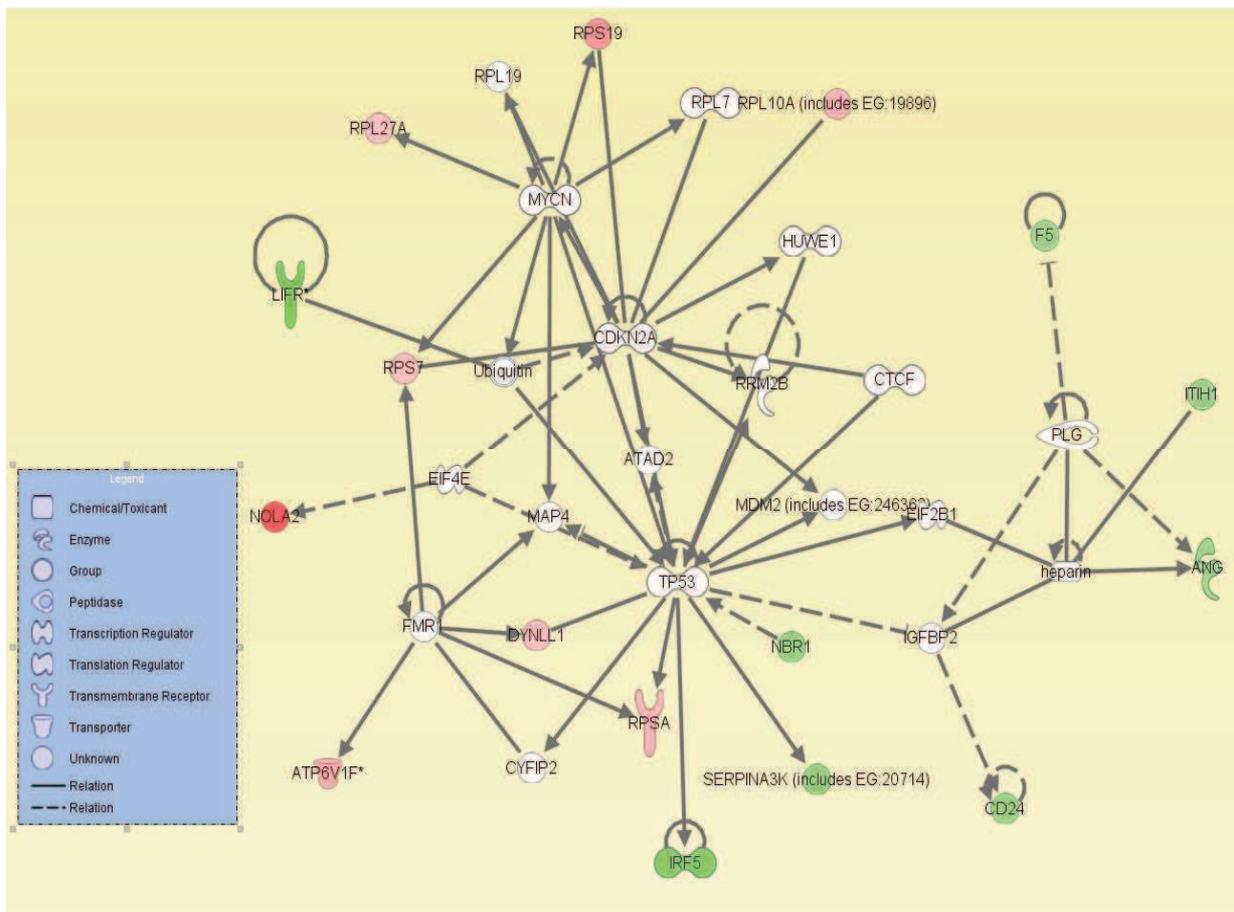
© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 4.3.6 A1: Netzwerk Lipidmetabolismus, molekularer Transport und Biochemie kleiner Moleküle

Das Netzwerk Lipidmetabolismus, molekularer Transport und Biochemie kleiner Moleküle weist zehn Gene mit induzierter Expression auf. Zu diesen gehören AQP4, BOLA2, FABP1, GALK1, GAS5, PTGDS, RPS7, SKP1, VNN1 und WDR77. Sechs Gene des Netzwerkes sind reprimiert, zu ihnen gehören ATP4A, FADS1, FOXA3, ITPR2, RBP1 und SOCS2. Die zentralen Moleküle des Netzwerkes sind TNF, PPARA und PPARG, welche aber nicht signifikant reguliert sind. Untereinander besitzen die signifikant regulierten Gene keine Beziehung.

## Experimente und Ergebnisse

Path Designer Network 2



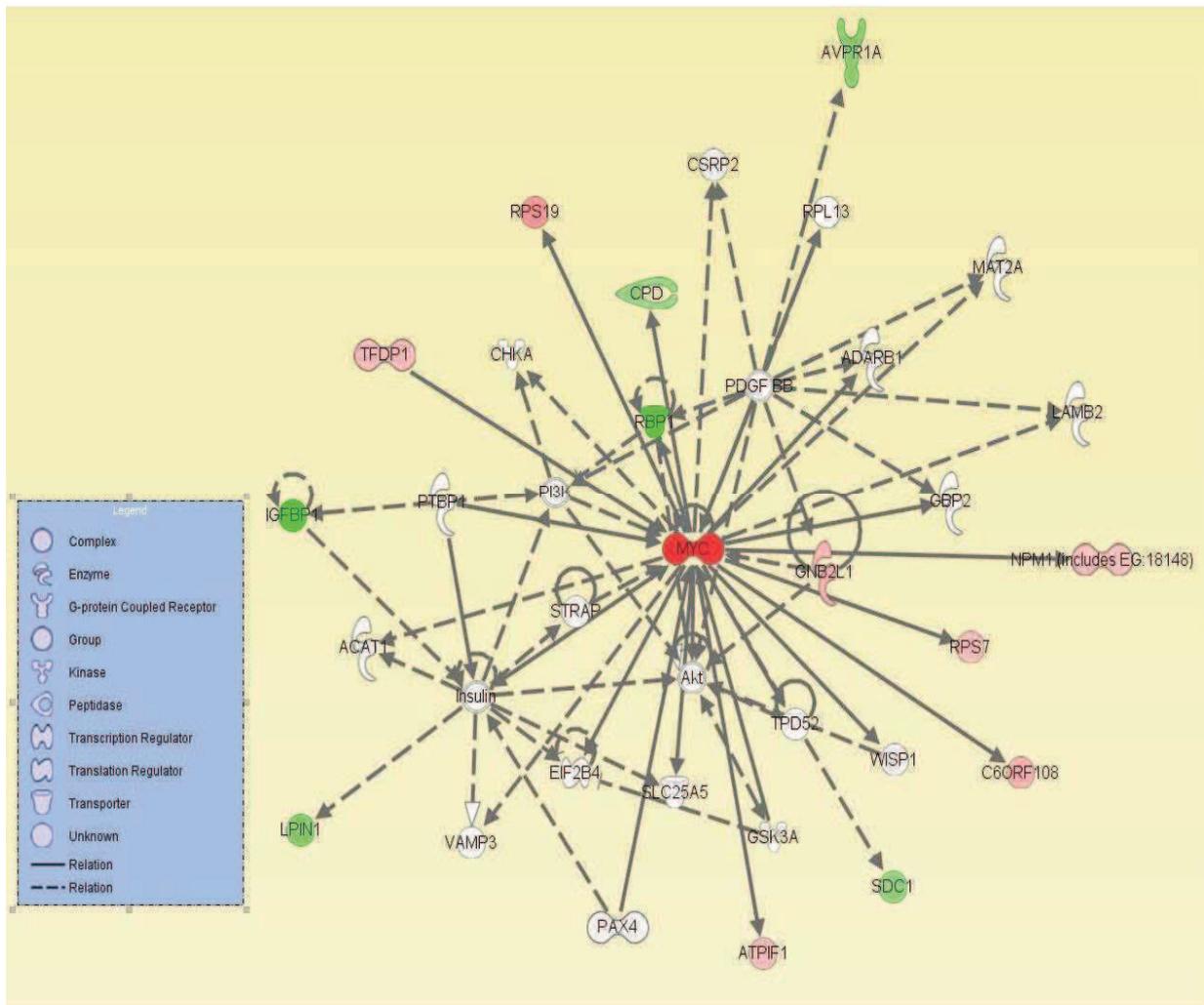
© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 4.3.6 A2: Netzwerk Krebs, Proteinsynthese und zelluläre Bewegung

Das Netzwerk Krebs, Proteinsynthese und zelluläre Bewegung weist acht induzierte und acht reprimierte Gene auf. Induziert sind ATP6V1F, DYNLL1, NOLA2, RPSA, RPS7, RPS19, RPL10A und RPL27A, reprimiert die Gene ANG, CD24, F5, IRF5, ITIH1, LIFR, NBR1 und Serpina3K. Die zentralen Moleküle des Netzwerks sind TP53, CDKN2A und MYCN, die nicht signifikant reguliert sind. Keines der regulierten Gene steht mit einem anderen regulierten Gen in direkter Interaktion.

## Experimente und Ergebnisse

Path Designer Network 3



© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

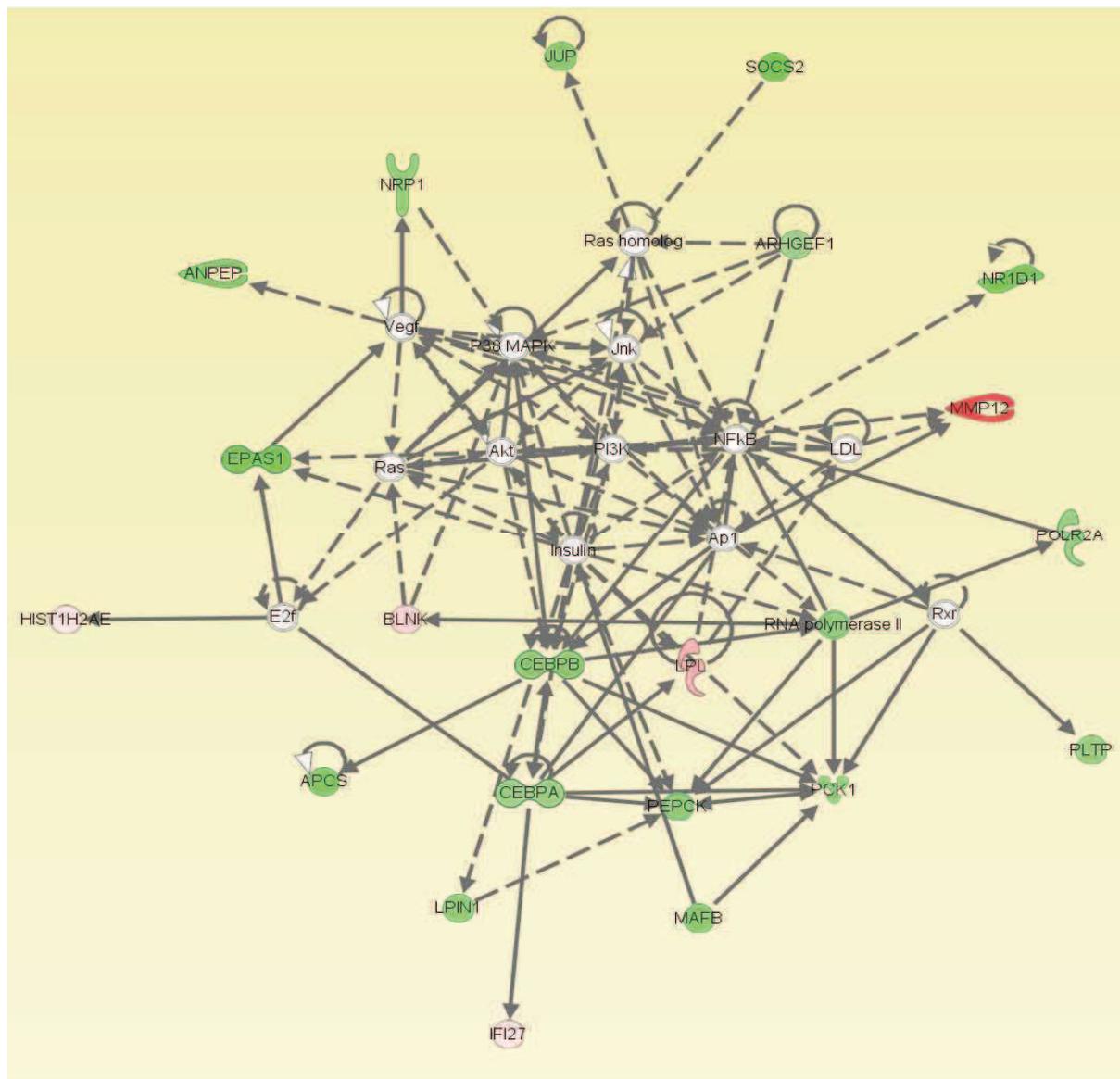
Abb. 4.3.6 A3: Zellzyklus, Entwicklung und Funktion des Haars und der Haut und Stoffwechselkrankheiten

Das dritte Netzwerk beinhaltet Zellzyklus, Entwicklung und Funktion des Haars und der Haut und Stoffwechselkrankheiten. Bei diesem Netzwerk sind acht Gene induziert und sechs Gene reprimiert. Zu den induzierten Genen des Netzwerkes gehören ATPIF1, C6ORF108, GNB2L1, MYC, NPM1, RPS7, RPS19 und TFDP1. Zu den reprimierten Genen gehören AVPR1A, CPD, IGFBP, LPIN1, RBP und SDC1. Das zentrale Molekül dieses Netzwerkes ist MYC, welches von den Genen im Netzwerk am stärksten induziert ist und zu allen weiteren induzierten Genen im Netzwerk eine direkte Interaktion aufweist.

Die drei am stärksten gewichteten Netzwerke in sechs Monate alten Tieren waren das Netzwerk zur 1: Genexpression, Lipidmetabolismus und molekularer Transport; 2: Proteinsynthese und Zellzyklus; 3: Zellzyklus und Krebs.

## Experimente und Ergebnisse

Path Designer Network 1



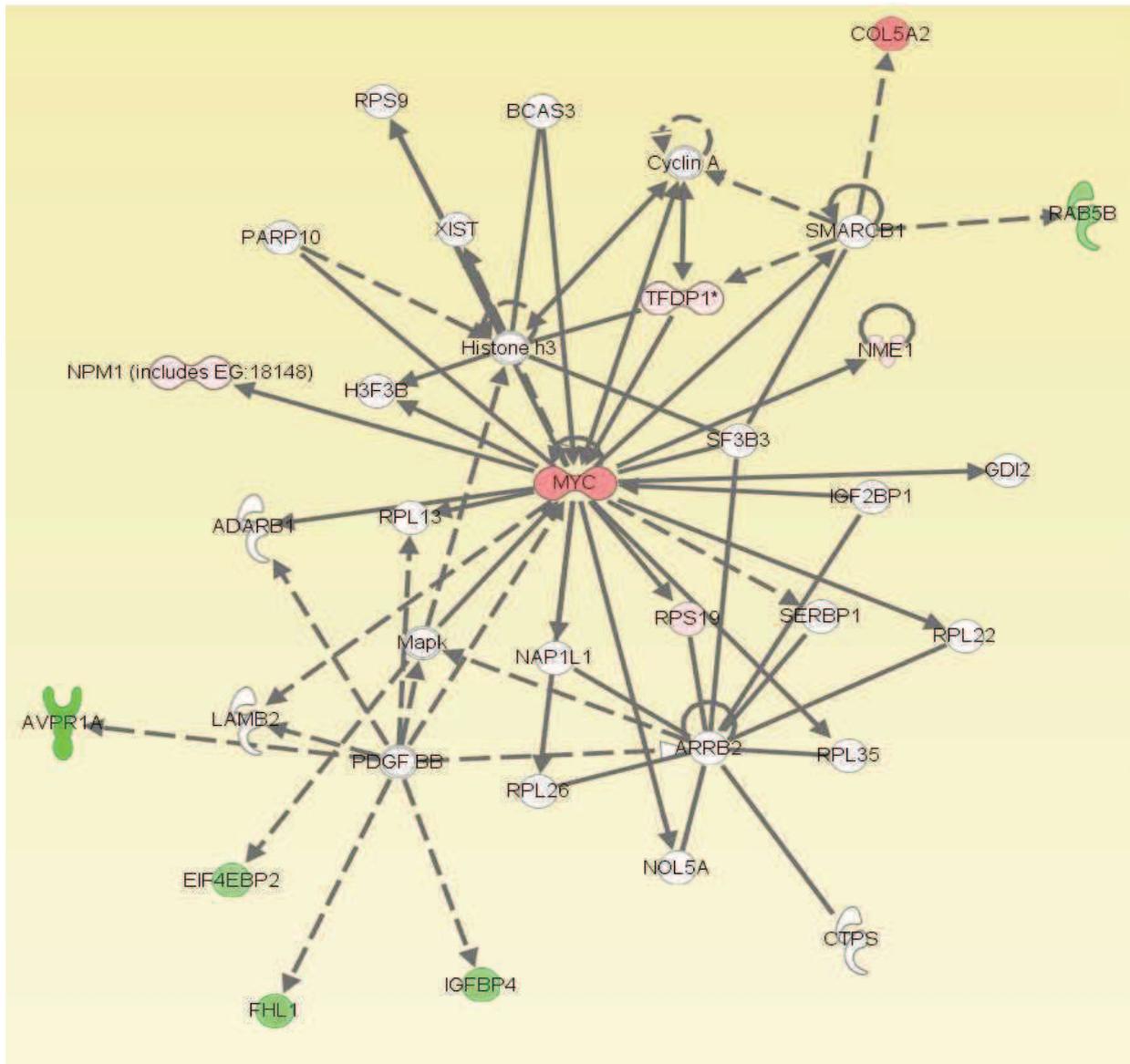
© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 4.3.6 B1: Genexpression, Lipidmetabolismus und molekularer Transport

Das am stärksten gewichtete Netzwerk in sechs Monate alten Tieren ist das Netzwerk für Genexpression, Lipidmetabolismus und molekularen Transport. Hierbei sind 17 der im Netzwerk enthaltenen Gene reprimiert und fünf Gene induziert. Die im Zentrum des Netzwerkes befindlichen Gene sind NF $\kappa$ B („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“), P38MAPK, AP1 und AKT (kodiert eine Serin-Threonin-Proteinkinase B), welche nicht signifikant reguliert sind. Zwölf der regulierten Gene interagieren miteinander in diesem Netzwerk, hierzu gehören APCS, CEBP $\alpha$  und  $\beta$ , LPIN1, MAFB, PCK1, PEPCK, POLR2A und RNS-Polymerase II von den reprimierten Genen und BLNK, IFI27 und LPL von den induzierten Genen.

## Experimente und Ergebnisse

Path Designer Network 2



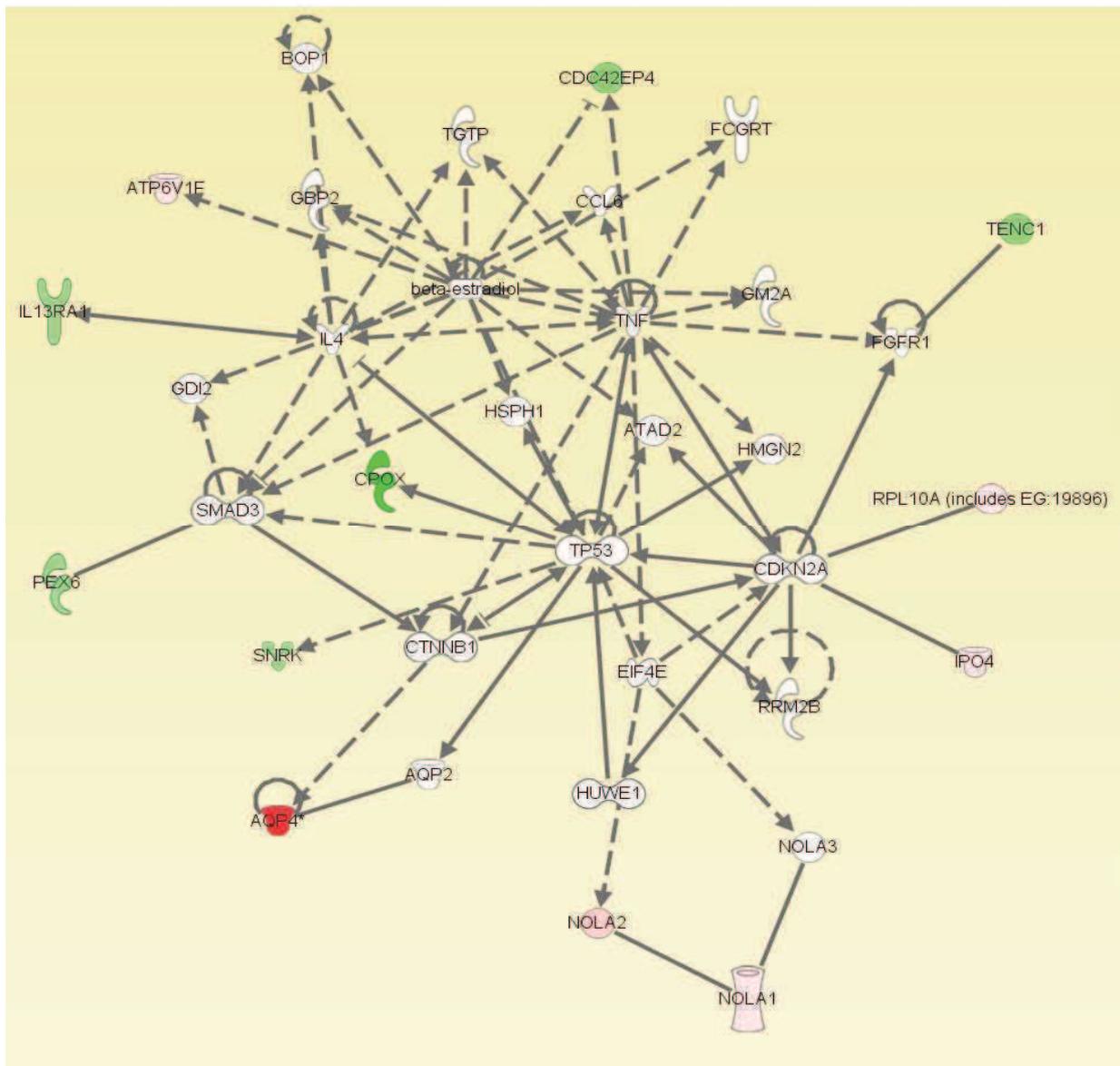
© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 4.3.6 B2: Proteinsynthese und Zellzyklus

Das Netzwerk für Proteinsynthese und Zellzyklus ist das mit sechs induzierten und fünf reprimierten Genen am zweitstärksten gewichtete Netzwerk. In diesem Netzwerk ist das zentrale Gen c-Myc, welches induziert reguliert ist. Dieses besitzt eine bereits bekannte Beziehung zu allen induzierten Genen mit Ausnahme zu COL5A2. Alle reprimierten Gene (AVPR1A, EIF4EBP2, FHL1, IGFBP4 und RAB5b) weisen keine bekannte Verbindung zu MYC auf und auch keine zu einem anderen regulierten Gen.

## Experimente und Ergebnisse

Path Designer Network 4



© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 4.3.6 B3: Zellzyklus und Krebs

Das Netzwerk Zellzyklus und Krebs beinhaltet sechs induzierte und sechs reprimierte Gene. Zu den zentralen Genen im Netzwerk gehören TP53, TNF, beta estradiol und CDKN2A, welche alle nicht signifikant reguliert sind. Die einzige Interaktion zwischen zwei in diesem Fall induzierten Gene haben NOLA1 und NOLA2.

Für die zwölf Monate alten Tiere waren die Netzwerke 1: Entwicklungsstörung, neurologische Krankheiten und Krebs; 2: DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur; 3: Lipidmetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle am stärksten gewichtet.

## Experimente und Ergebnisse

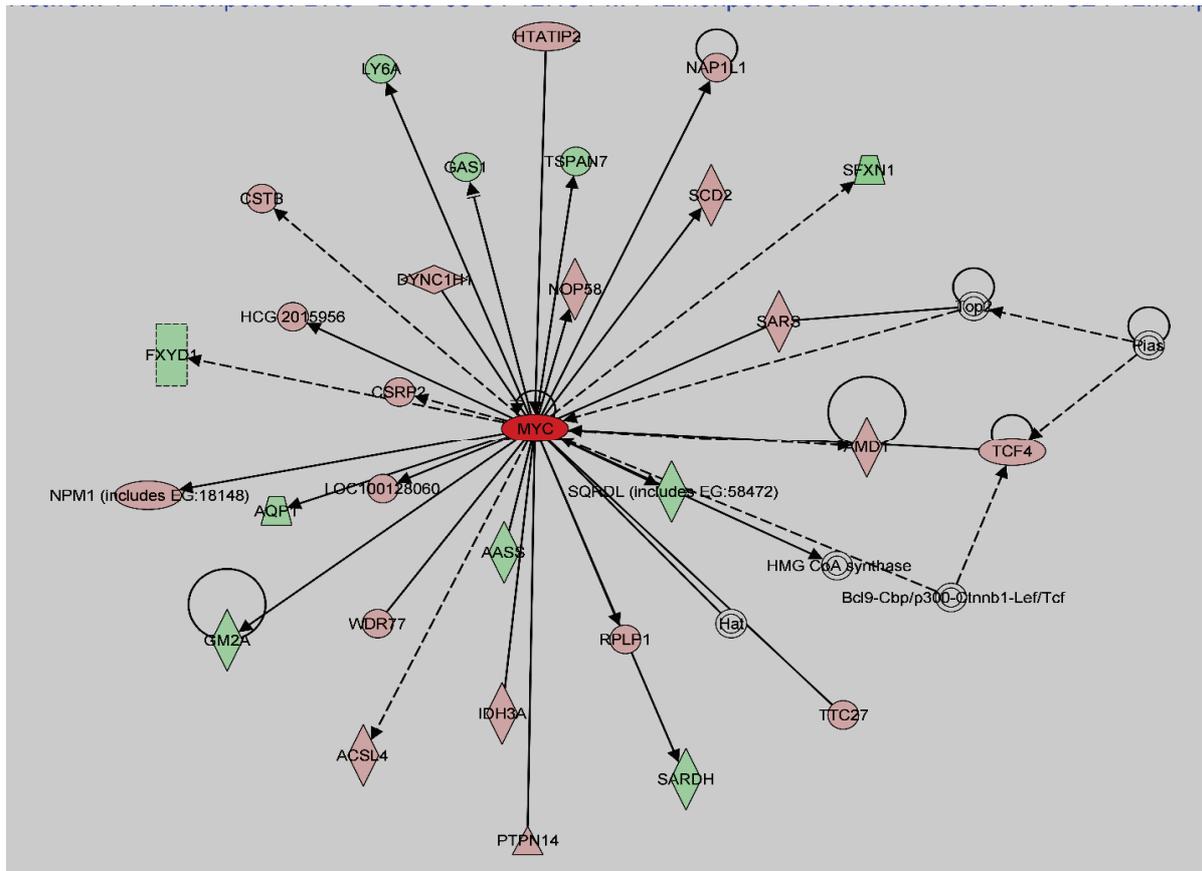


Abb. 4.3.6 C1: Entwicklungsstörung, neurologische Krankheiten und Krebs

Das Netzwerk Entwicklungsstörung, neurologische Krankheiten und Krebs beinhaltet 20 induzierte und zehn reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist MYC, welches am stärksten signifikant induziert ist.

## Experimente und Ergebnisse

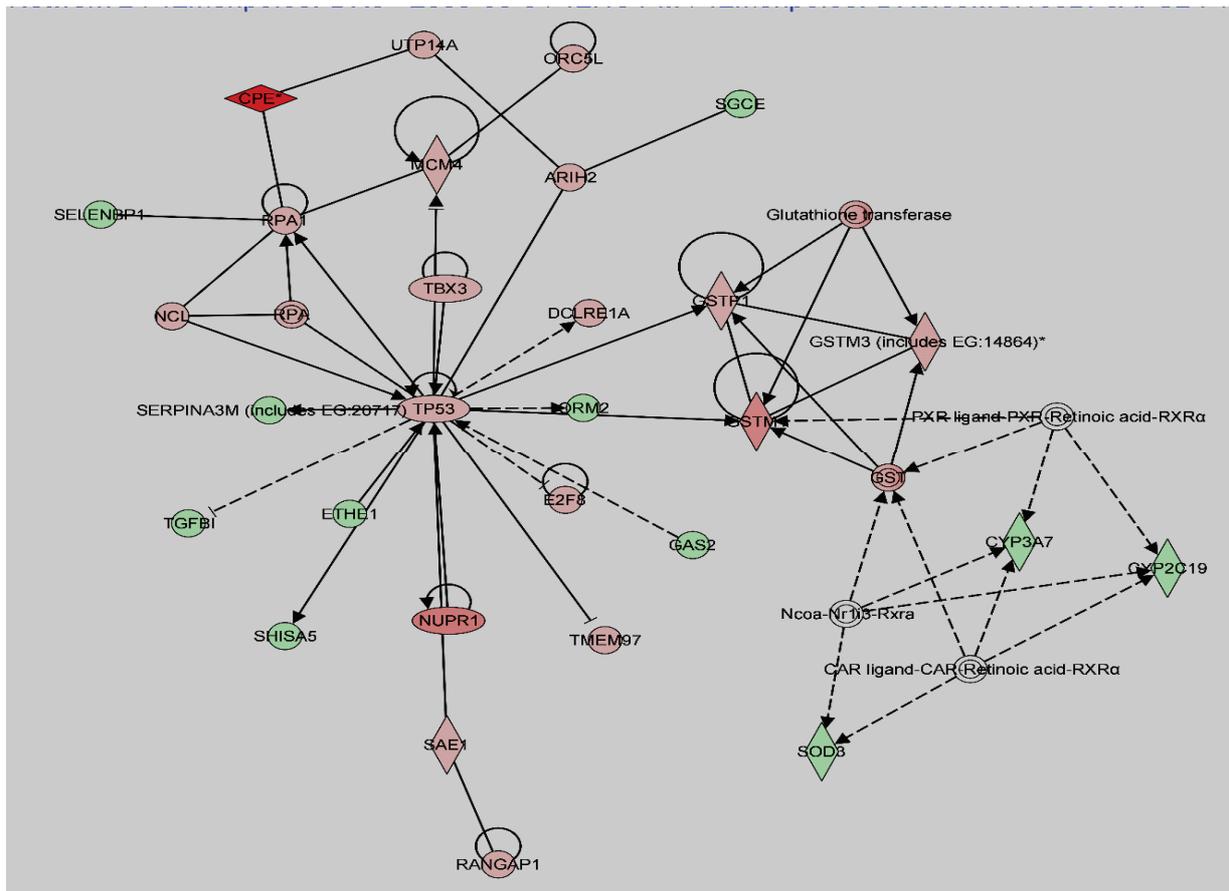


Abb. 4.3.6 C2: DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur

Das Netzwerk DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur beinhaltet 21 induzierte und elf reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist TP53, welches signifikant induziert ist. Am stärksten signifikant induziert ist das Gen CPE (Carboxypeptidase E), welches am Rand des Netzwerkes liegt.

## Experimente und Ergebnisse

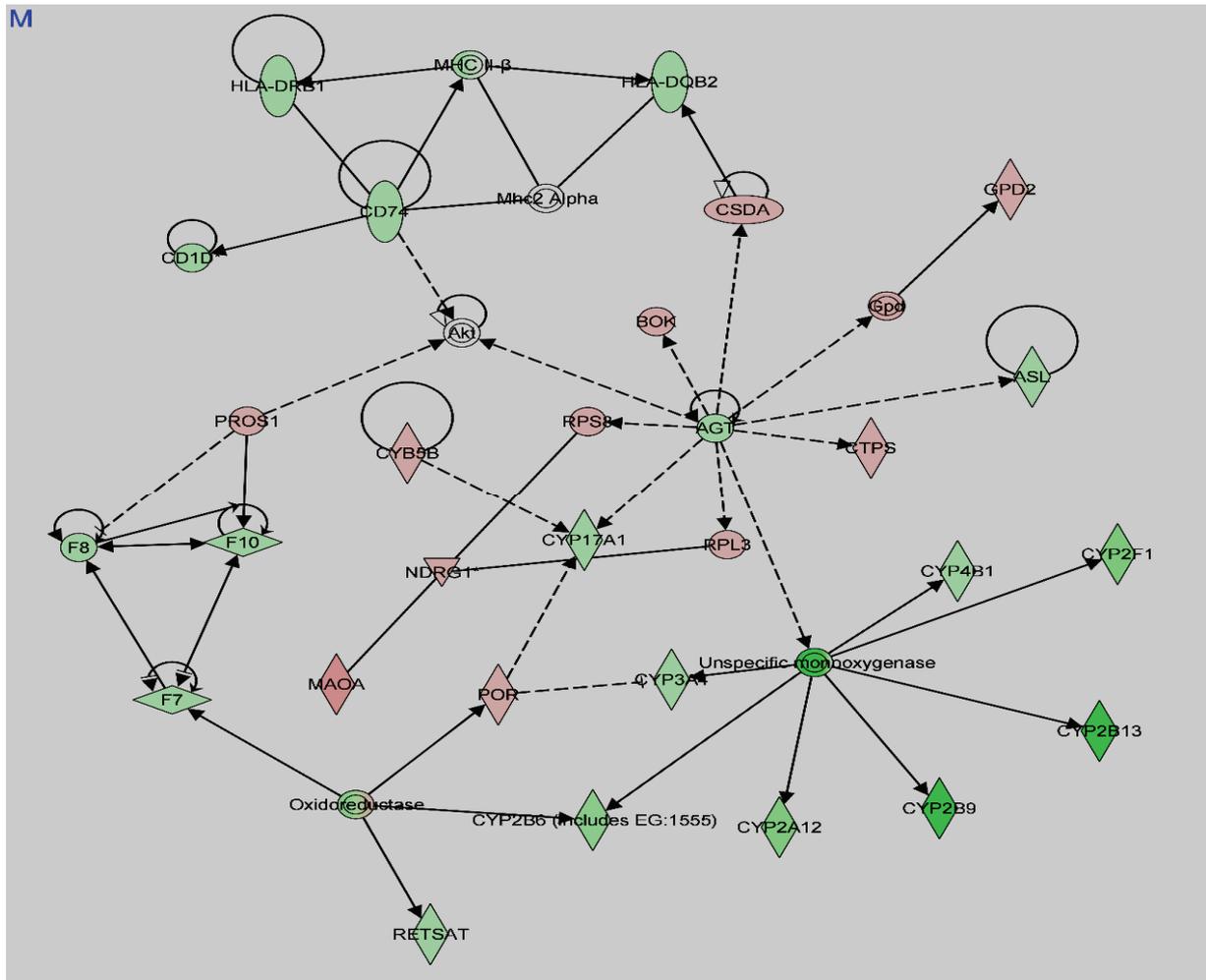


Abb. 4.3.6 C3: Lipidmetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle

Das Netzwerk Lipidmetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle beinhaltet zwölf induzierte und 21 reprimierte Gene. Die beiden zentralen Gene im Netzwerk sind AGT und die unspezifische Monooxygenase, welche beide signifikant reprimiert sind. Am stärksten signifikant reprimiert sind die Gene CYP2B9, CYP2B13 (sie gehören zur Zytochrom P450-Familie) und die unspezifische Monooxygenase.

Für die Exon Arrays wurde die Analyse in signifikant regulierte Gene und Gene mit signifikant alternativem Exon-Gebrauch aufgeteilt. Es wurden ferner die Krankheitsstufen Kontroll-, Dysplasie- und Tumorgewebe unterschieden.

Die am stärksten regulierten Netzwerke für die signifikant regulierten Gene des Kontrollgewebes Aat-Myc-transgener Tiere waren Netzwerke 1: Zellmorphologie, hämatologische Systementwicklung und Funktion sowie Krebs; 2: RNS-posttranskriptionale

## Experimente und Ergebnisse

Modifikation, Aminosäure-Metabolismus und posttranslationale Modifikation; 3: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Magen-Darm-Erkrankung.

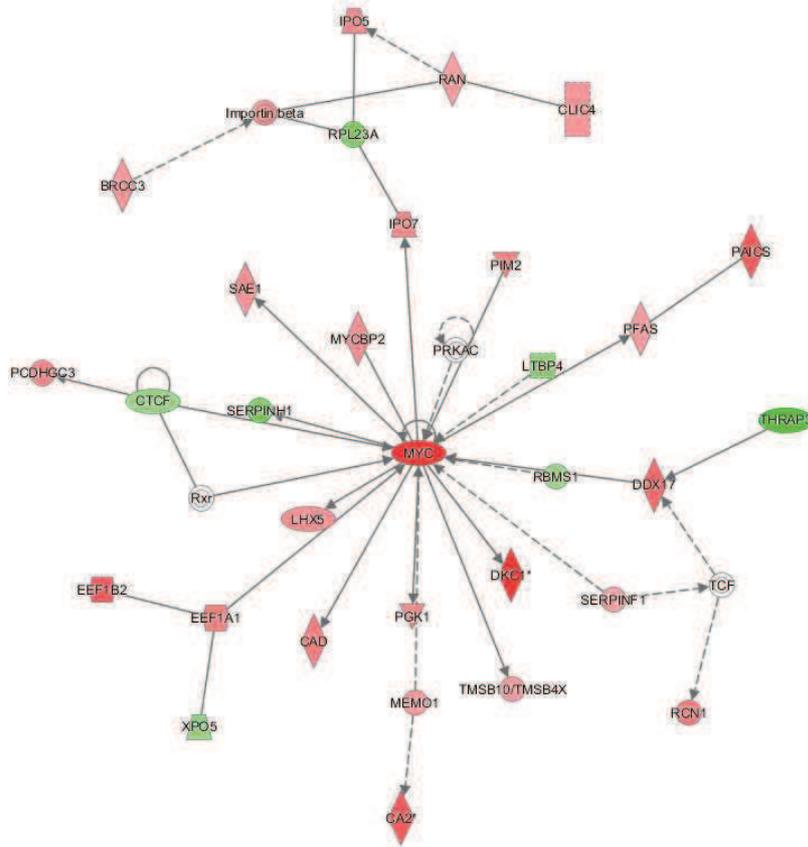


Abb. 4.3.6 D1: Zellmorphologie, hämatologische Systementwicklung und Funktion und Krebs

Das Netzwerk Zellmorphologie, hämatologische Systementwicklung und Funktion sowie Krebs beinhaltet 25 induzierte und sieben reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist MYC, welches neben DKC1 (Dyskeratosis Congenita 1) am stärksten signifikant induziert ist.

## Experimente und Ergebnisse

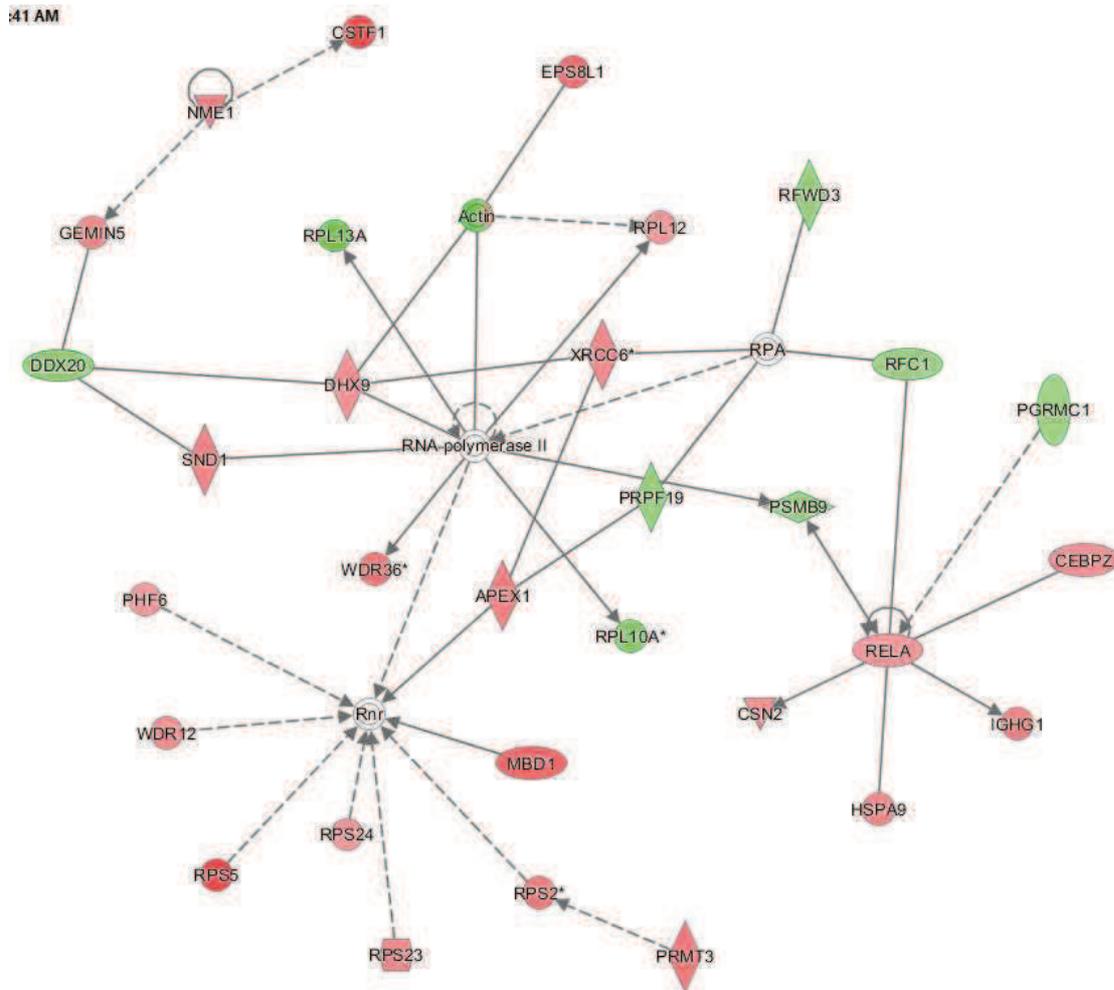


Abb. 4.3.6 D2: RNS-posttranskriptionale Modifikation, Aminosäure-Metabolismus und posttranslationale Modifikation

Das Netzwerk RNS-posttranskriptionale Modifikation, Aminosäure-Metabolismus und posttranslationale Modifikation beinhaltet 22 induzierte und neun reprimierte Gene. Aktin ist in diesem Netzwerk induziert und reprimiert. Die zentralen Gene im Netzwerk sind RNR (Ribonukleotidreduktase), RELA (V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A) und die RNS-Polymerase II, von denen lediglich RELA signifikant induziert ist; die beiden anderen Gene sind nicht reguliert.

## Experimente und Ergebnisse

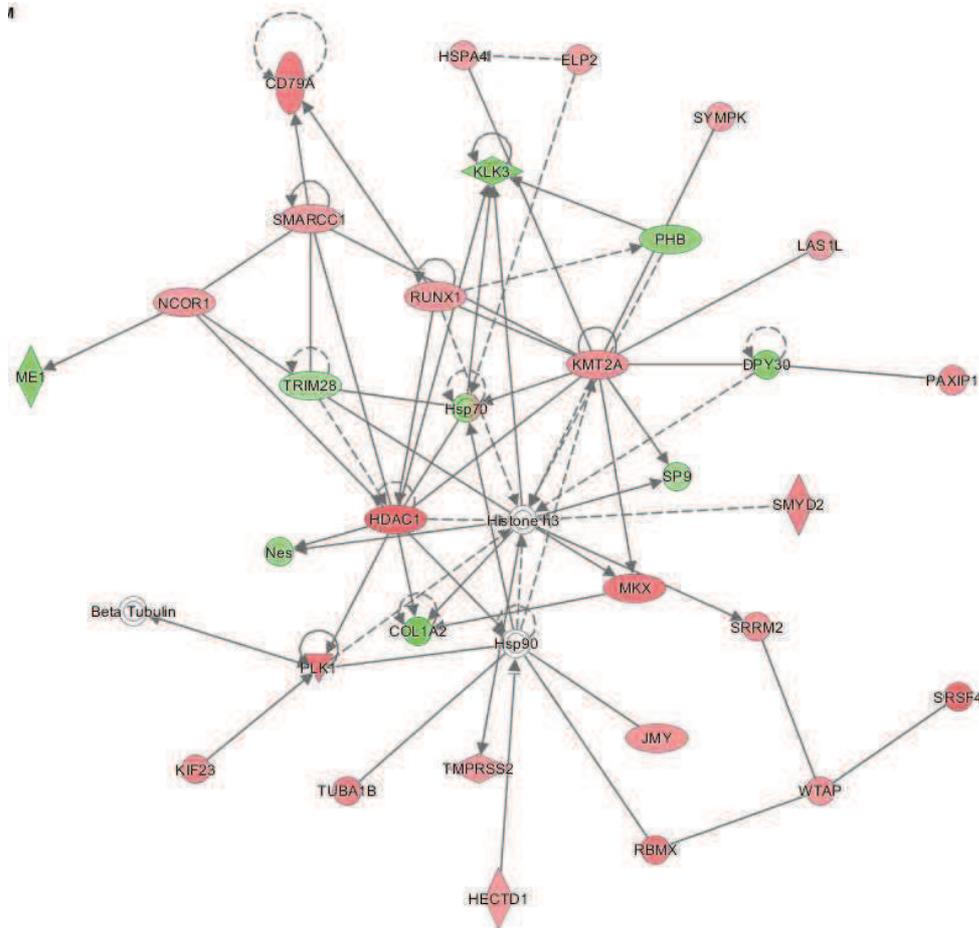


Abb. 4.3.6 D3: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Magen-Darm-Erkrankung

Das Netzwerk Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Magen-Darm-Erkrankung beinhaltet 25 induzierte und neun reprimierte Gene. HSP70 (Heat shock 70 kDa protein) liegt in diesem Netzwerk induziert und reprimiert vor. Das zentrale Gen im Netzwerk ist das Histon H3, welches nicht reguliert vorliegt.

Die am stärksten regulierten Netzwerke für die signifikant regulierten Gene des Dysplasie Gewebes Aat-Myc transgener Tiere waren Netzwerke 1: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Atemwegserkrankungen; 2: Krebs, Magen-Darm-Erkrankung und organische Verletzungen und Fehlbildungen; 3: Neurologische Erkrankung, Skelett- und Muskelerkrankungen und Krebs.

## Experimente und Ergebnisse

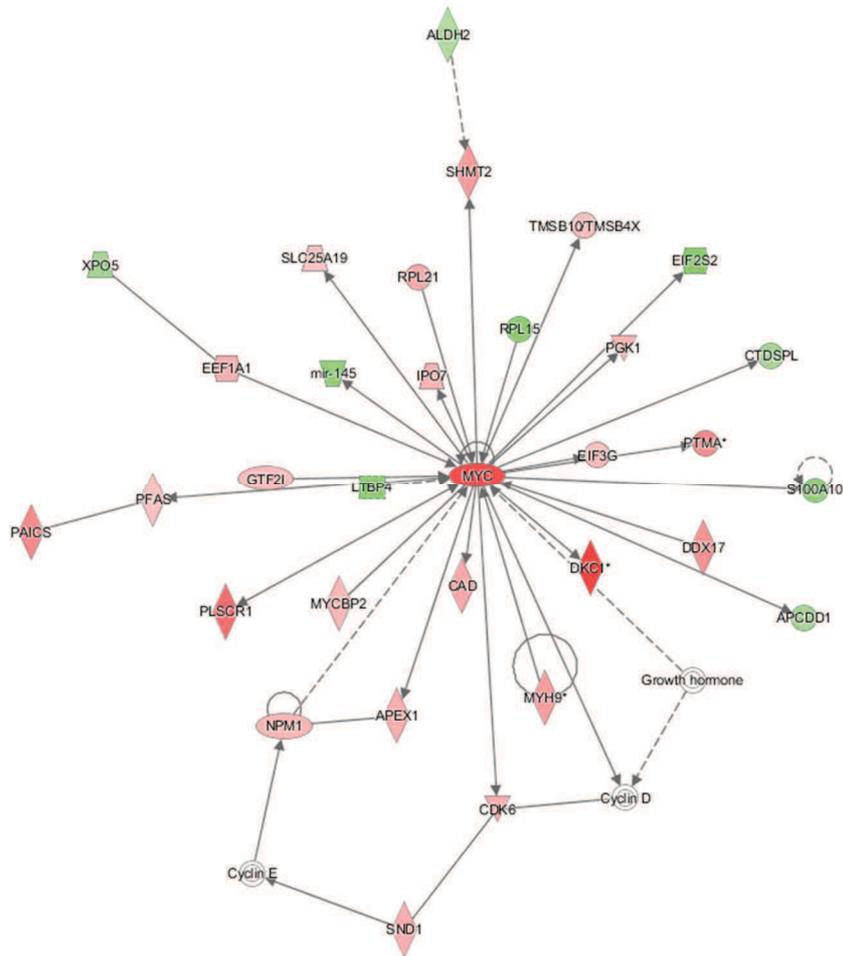


Abb. 4.3.6 E1: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Atemwegserkrankungen

Das Netzwerk Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen und Atemwegserkrankungen beinhaltet 23 induzierte und neun reprimierte Gene. MYC ist das zentrale Gen im Netzwerk, welches neben DKC1 (Dyskeratosis Congenita 1) am stärksten signifikant induziert vorliegt.

## Experimente und Ergebnisse

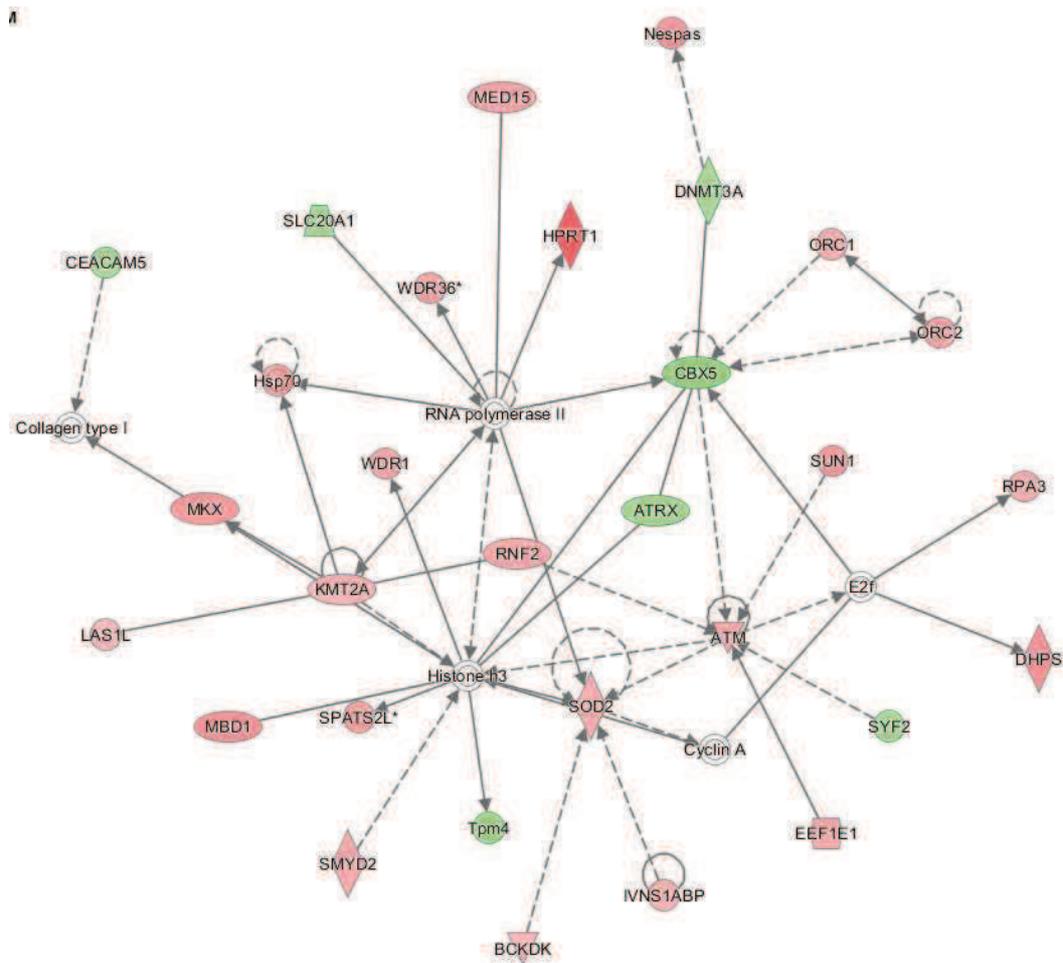


Abb. 4.3.6 E2: Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen und organische Verletzungen und Fehlbildungen

Das Netzwerk Krebs, Magen-Darm-Erkrankungen und organische Verletzungen und Fehlbildungen beinhaltet 23 induzierte und sieben reprimierte Gene. Die zentralen Gene im Netzwerk sind RNS-Polymerase II und Histon H3, welche beide nicht reguliert vorliegen.

## Experimente und Ergebnisse

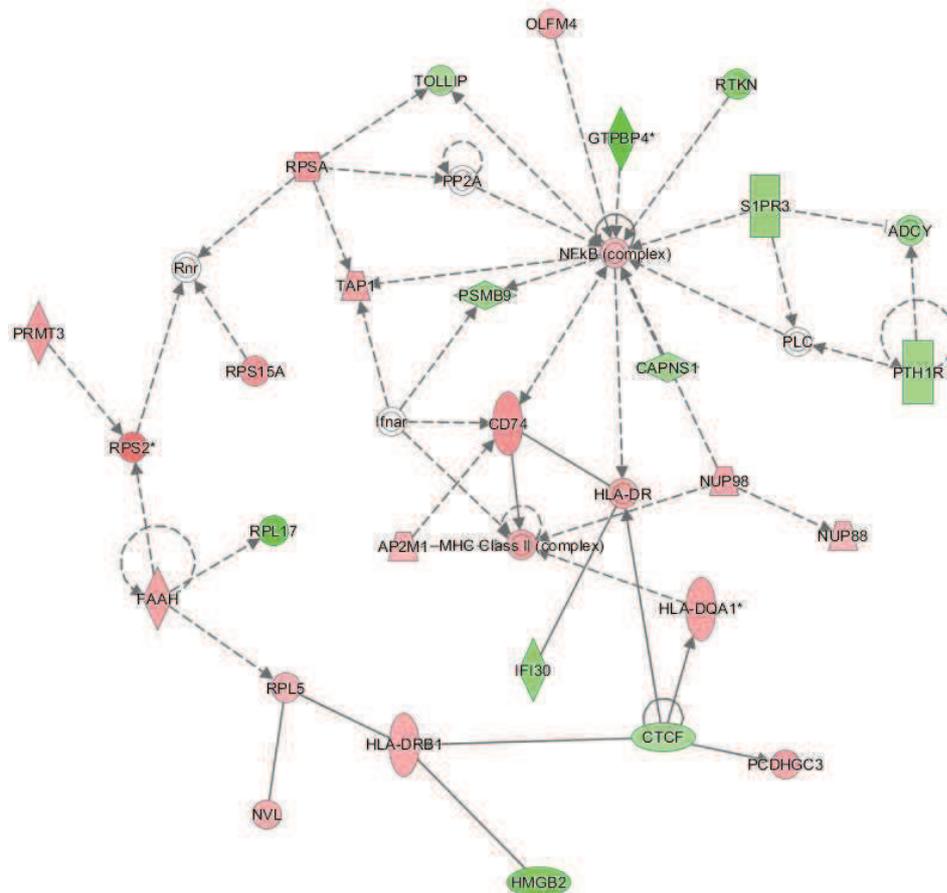


Abb. 4.3.6 E3: Neurologische Erkrankung, Skelett- und Muskelerkrankungen und Krebs.

Das Netzwerk Neurologische Erkrankung, Skelett- und Muskelerkrankungen sowie Krebs beinhaltet 19 induzierte und zwölf reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist der NF $\kappa$ B (Komplex; „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“), welcher signifikant induziert vorliegt.

Die am stärksten regulierten Netzwerke für die signifikant regulierten Gene des Tumorgewebes Aat-Myc-transgener Tiere waren Netzwerke 1: Protein-Synthese, dermatologische Krankheiten und Konditionen und erbliche Störung; 2: Genexpression, Verdauungssystementwicklung und Funktion und embryonale Entwicklung; 3: Zell-Zell-Signalwege und Interaktionen, Entwicklungsstörung und Erbkrankheit.

## Experimente und Ergebnisse

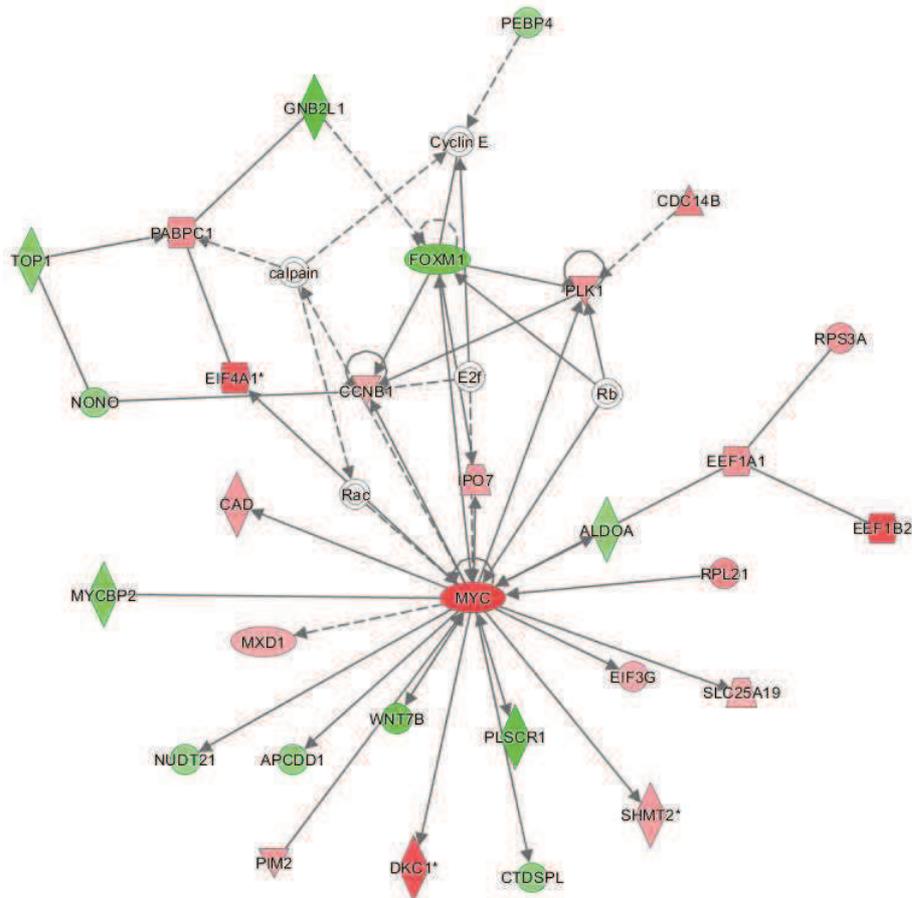


Abb. 4.3.6 F1: Protein-Synthese, dermatologische Krankheiten und Konditionen und erbliche Störung

Das Netzwerk Protein-Synthese, dermatologische Krankheiten und Konditionen sowie erbliche Störung beinhaltet 18 induzierte und zwölf reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist MYC, welches unter anderen am stärksten signifikant induziert vorliegt. Am stärksten signifikant reprimiert liegt GNB2L1 (Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Beta Polypeptide 2-Like 1) vor.

## Experimente und Ergebnisse

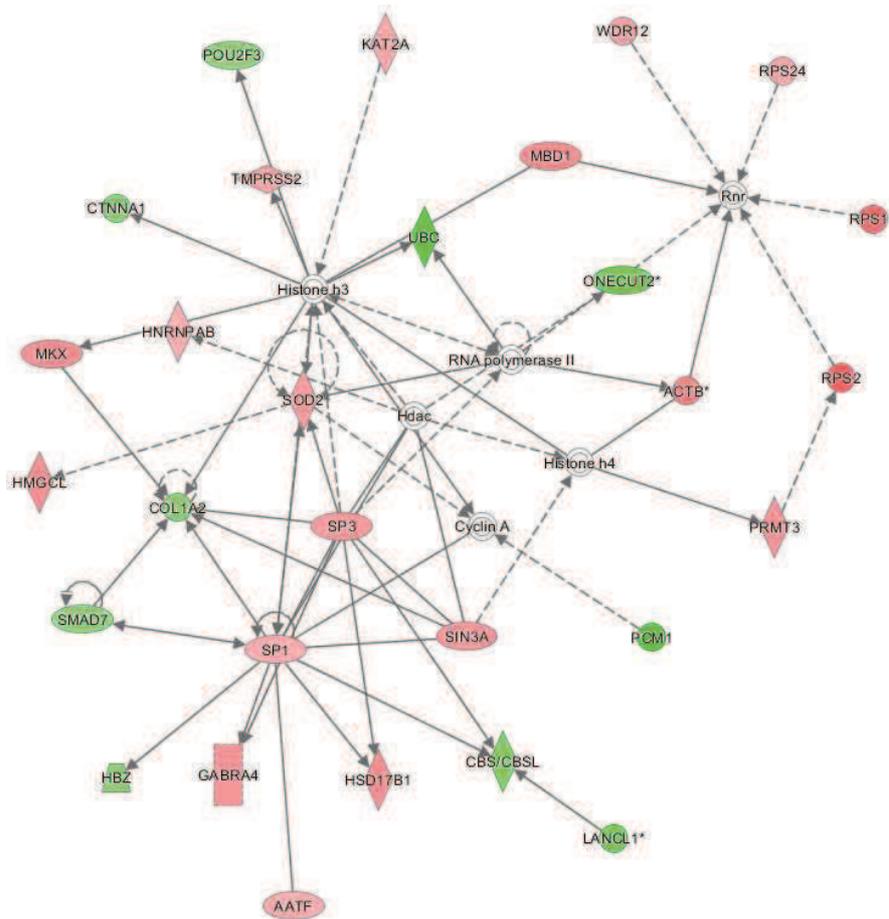


Abb. 4.3.6 F2: Genexpression, Verdauungssystementwicklung und Funktion und embryonale Entwicklung

Das Netzwerk Genexpression, Verdauungssystementwicklung und Funktion sowie embryonale Entwicklung beinhaltet 19 induzierte und zehn reprimierte Gene. Die zentralen Gene im Netzwerk sind SP3 (SP3-Transkriptionsfaktor), Histone H4 und RNA-Polymerase II, wobei nur SP3 signifikant induziert vorliegt.

## Experimente und Ergebnisse

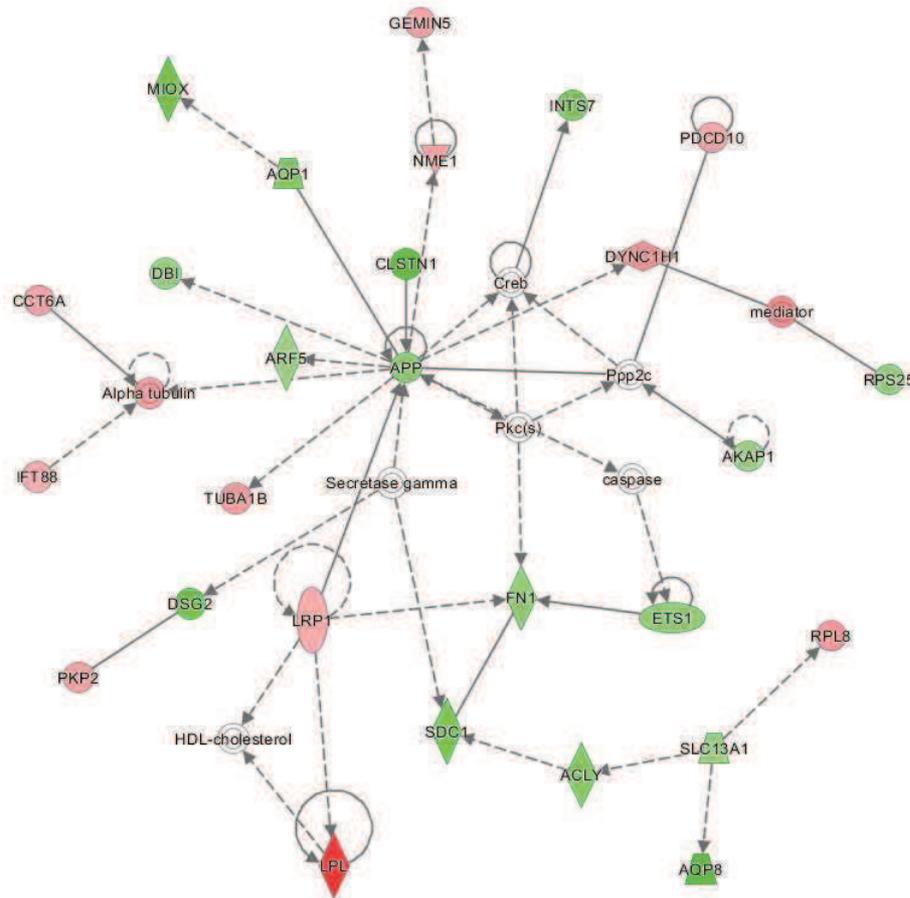


Abb. 4.3.6 F3: Zell-Zell-Signalwege und Interaktionen, Entwicklungsstörung und Erbkrankheit

Das Netzwerk Zell-Zell-Signalwege und Interaktionen, Entwicklungsstörung sowie Erbkrankheit beinhaltet 13 induzierte und 16 reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist APP (Amyloid Beta (A4) Precursor Protein), welches signifikant reprimiert vorliegt. Am stärksten signifikant induziert liegt LPL (Lipoprotein-Lipase) vor, welches am Rand des Netzwerkes liegt.

Die am stärksten regulierten Netzwerke für die Gene mit signifikant alternativem Exon-Gebrauch des Kontrollgewebes Aat-Myc-transgener Tiere waren Netzwerke 1: Zelltod und Überleben, Aminosäure-Metabolismus und posttranslationale Modifikationen; 2: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen, Erkrankungen der Nieren und urologische Krankheit; 3: Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle und Vitamin- und Mineralstoffwechsel.

## Experimente und Ergebnisse

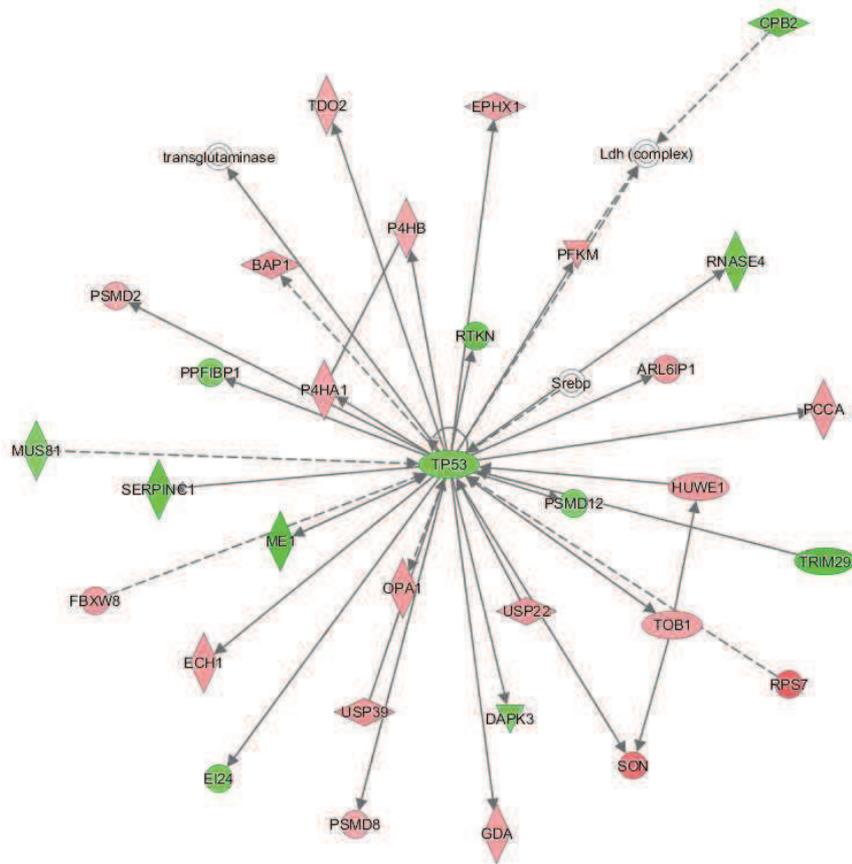


Abb. 4.3.6 G1: Zelltod und Überleben, Aminosäure-Metabolismus und posttranslationale Modifikationen

Das Netzwerk Zelltod und Überleben, Aminosäure-Metabolismus sowie posttranslationale Modifikationen beinhaltet 20 induzierte und zwölf reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist TP53 (Tumor Protein P53), welches signifikant reprimiert vorliegt.

## Experimente und Ergebnisse

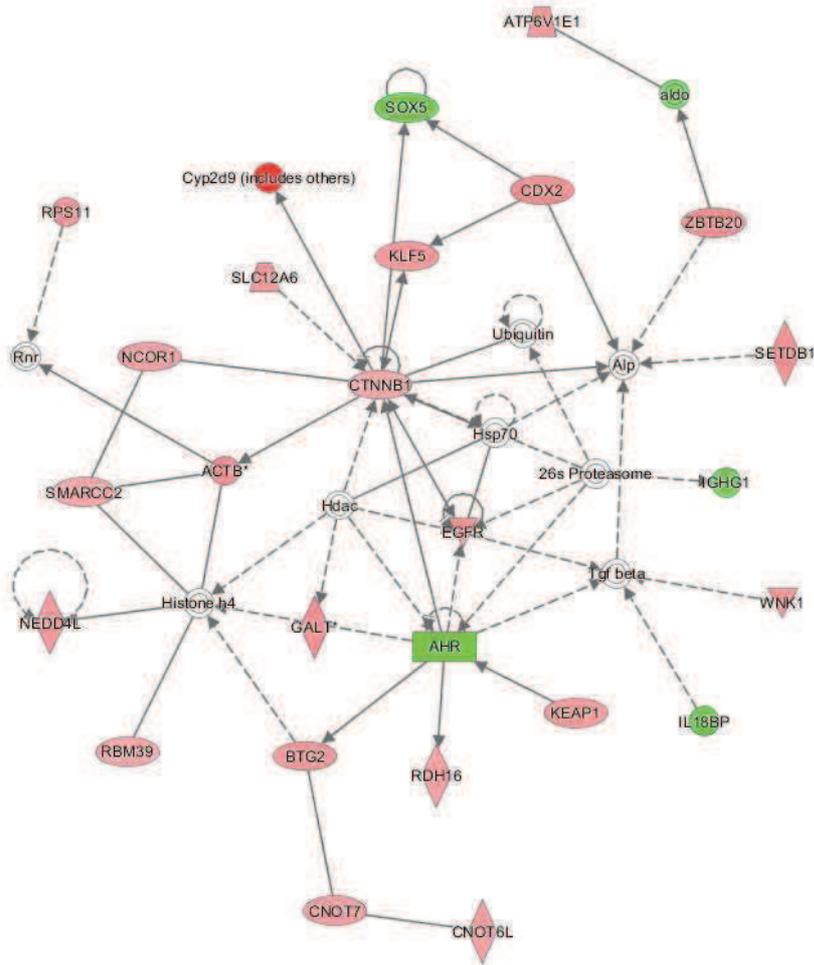


Abb. 4.3.6 G2: Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen, Erkrankungen der Nieren und urologische Krankheit

Das Netzwerk Krebs, organische Verletzungen und Fehlbildungen, Erkrankungen der Nieren und urologische Krankheit beinhaltet 22 induzierte und fünf reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist CTNNB1 (Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1), welches signifikant induziert vorliegt.

## Experimente und Ergebnisse

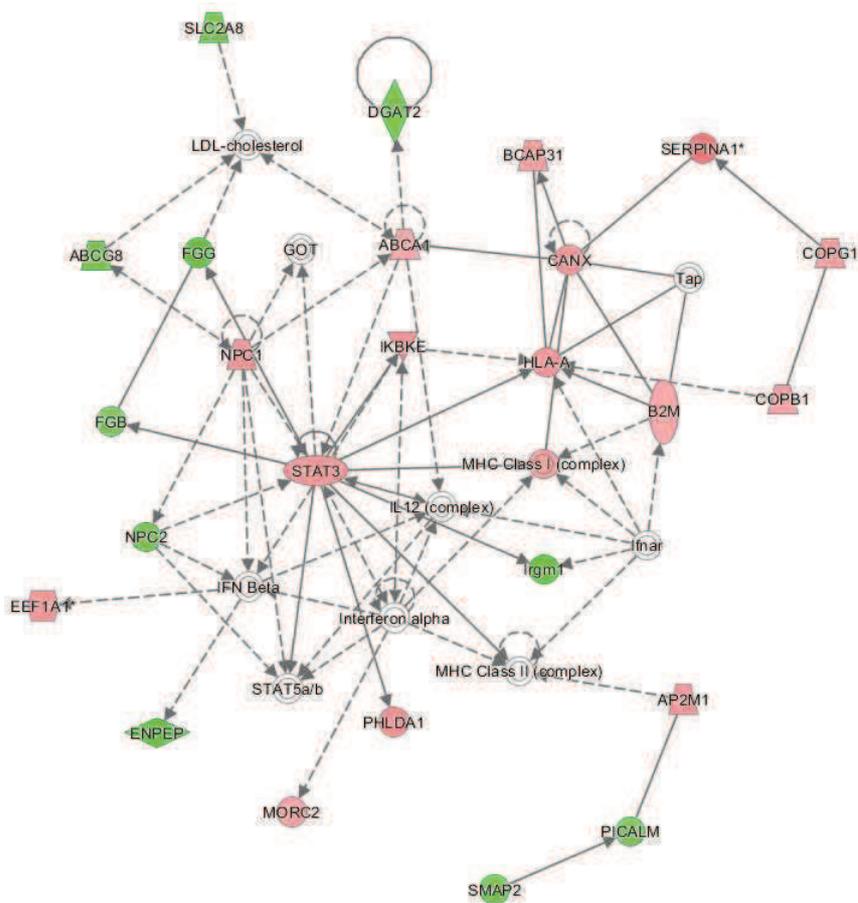


Abb. 4.3.6 G3: Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle und Vitamin- und Mineralstoffwechsel

Das Netzwerk Lipidstoffwechsel, Biochemie kleiner Moleküle und Vitamin- und Mineralstoffwechsel beinhaltet 16 induzierte und zehn reprimierte Gene. Die beiden zentralen Gene im Netzwerk sind Interferon Alpha, welches nicht reguliert ist, und STAT3 welches signifikant induziert ist. STAT3 („Signal Transducer and Activator of Transcription“) aktiviert die Transkription und fungiert als Akute-Phase-Antwortfaktor. Die am stärksten regulierten Netzwerke für die Gene mit signifikant alternativem Exon-Gebrauch im Dysplasie Gewebe Aat-Myc-transgener Tiere waren Netzwerke 1: Lipidstoffwechsel und Biochemie kleiner Moleküle; 2: Verdauungssystem-Entwicklung und Funktion, Organ-Morphologie und organische Entwicklung; 3: Embryonale Entwicklung, Entwicklung des Nervensystems und Funktion sowie Organentwicklung.

## Experimente und Ergebnisse

M

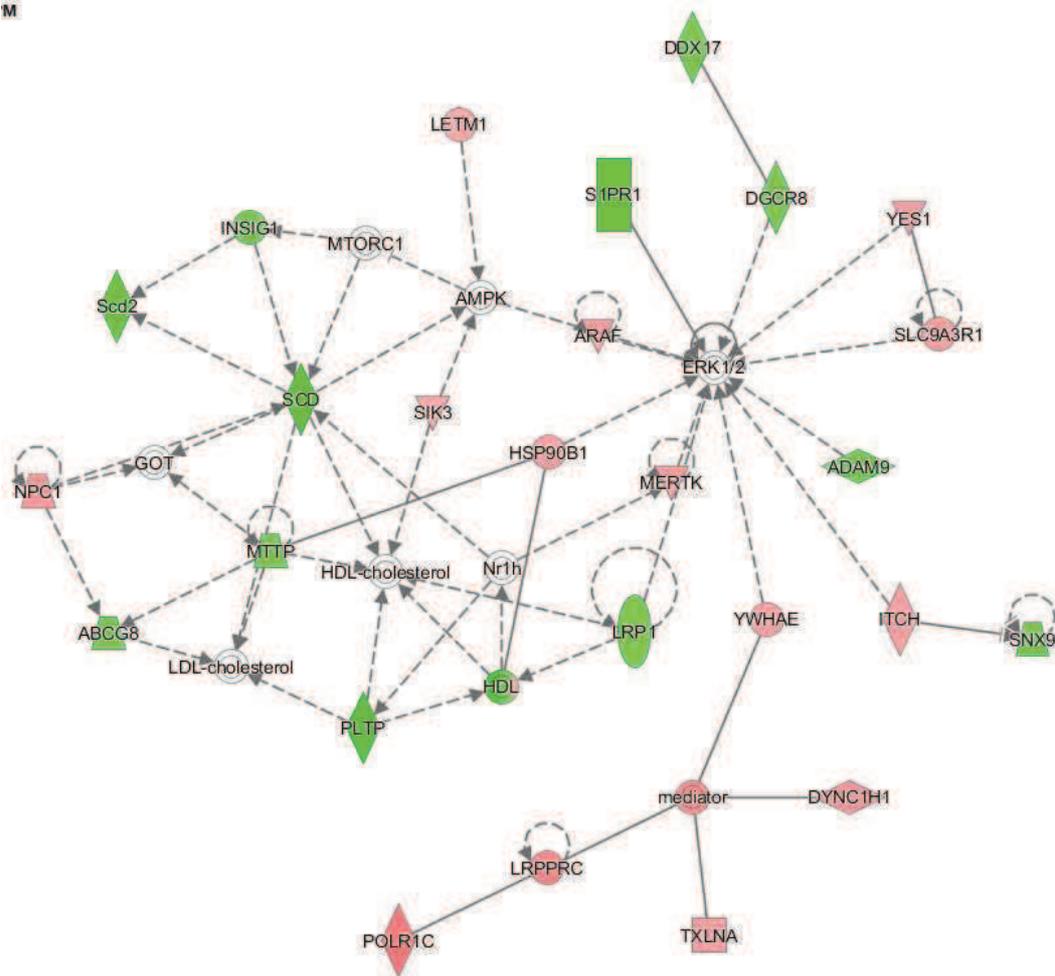


Abb. 4.3.6 H1: Lipidstoffwechsel und Biochemie kleiner Moleküle

Das Netzwerk Lipidstoffwechsel und Biochemie kleiner Moleküle beinhaltet 16 induzierte und 13 reprimierte Gene. Das zentrale Gen im Netzwerk ist ERK 1/2, welches nicht signifikant reguliert vorliegt. ERK 1/2 „extracellular-signal-regulated kinase“, welches auch als „Mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) bezeichnet wird, ist Teil des MAPK/ERK-Signalweges. HDL („High-Density-Lipoprotein-Cholesterin“) liegt sowohl reprimiert als auch induziert vor.

## Experimente und Ergebnisse

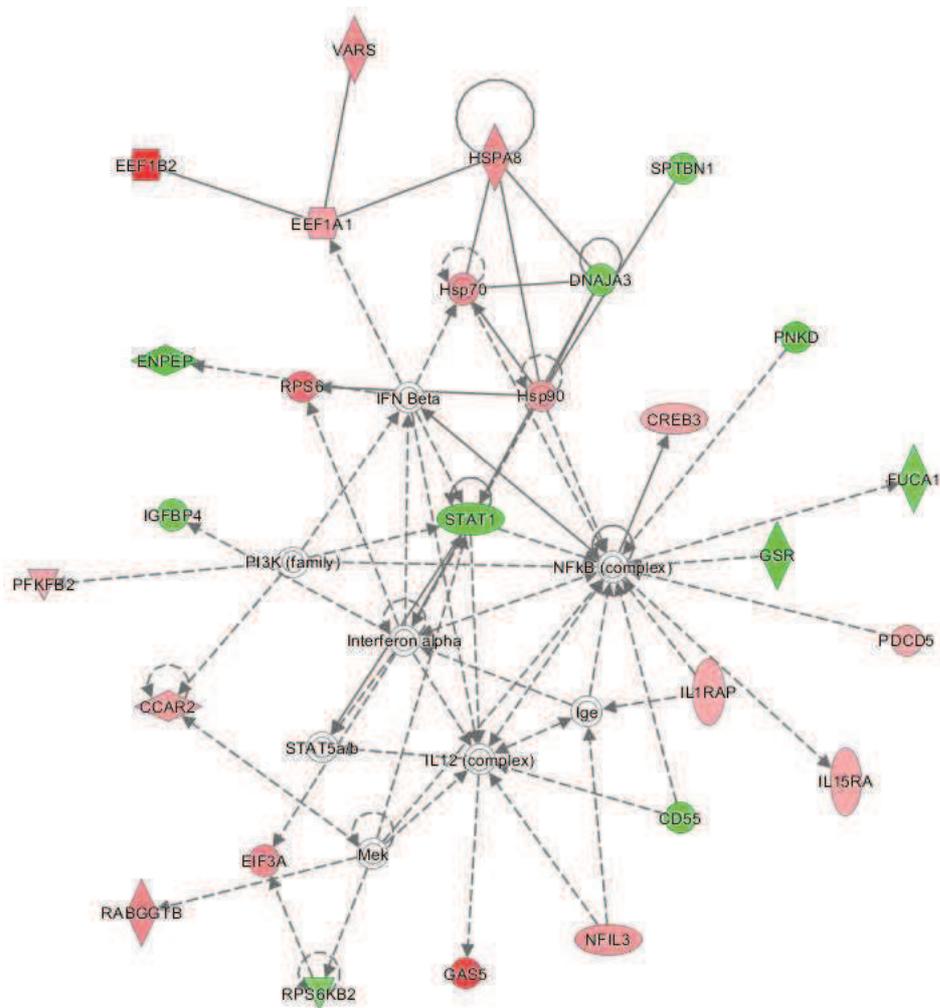


Abb. 4.3.6 H2: Verdauungssystem-Entwicklung und Funktion, Organ-Morphologie und organische Entwicklung

Das Netzwerk Verdauungssystem-Entwicklung und Funktion, Organ-Morphologie und organische Entwicklung beinhaltet 17 induzierte und zehn reprimierte Gene. Die zentralen Gene im Netzwerk sind der Transkriptionsfaktor NFκB („nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“) sowie Interferon alpha, welche nicht signifikant reguliert vorliegen. Am stärksten signifikant induziert liegt EE1B2 („Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Beta 2“) vor, welches sich am Rande des Netzwerkes befindet.

## Experimente und Ergebnisse

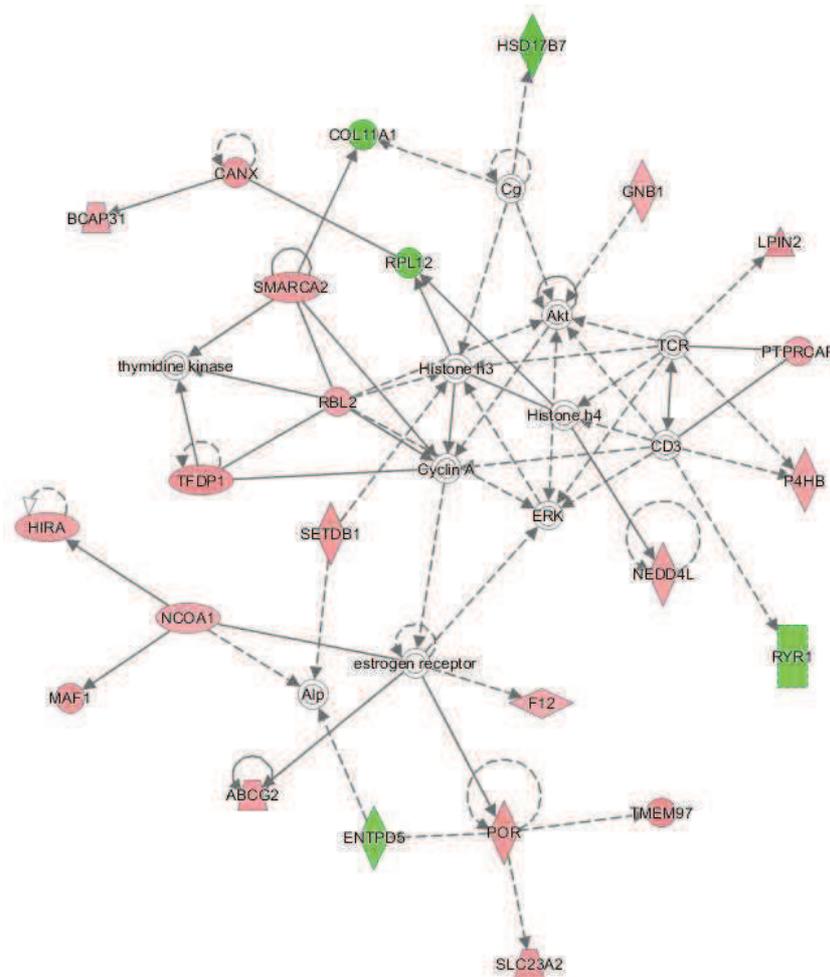


Abb. 4.3.6 H3: Embryonale Entwicklung, Entwicklung des Nervensystems und Funktion sowie Organentwicklung

Das Netzwerk Embryonale Entwicklung, Entwicklung des Nervensystems und Funktion sowie Organentwicklung beinhaltet 19 induzierte und fünf reprimierte Gene. Die zentralen Gene im Netzwerk sind Cyclin A, ERK („Extracellular-signal Regulated Kinases“), AKT (kodiert eine Serin-Threonin-Proteinkinase B) und Histon H3, welche alle nicht signifikant reguliert vorliegen.

Die am stärksten regulierten Netzwerke für die Gene mit signifikant alternativem Exon-Gebrauch im Tumorgewebe Aat-Myc-transgener Tiere waren Netzwerke 1: RNS-posttranskriptionale Modifikation, Herz-Kreislauf-Krankheit und Entwicklungsstörung; 2: Protein-Synthese, DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur sowie Genexpression; 3: Zellulärer Kompromiss, DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur sowie Aminosäure-Metabolismus.

## Experimente und Ergebnisse

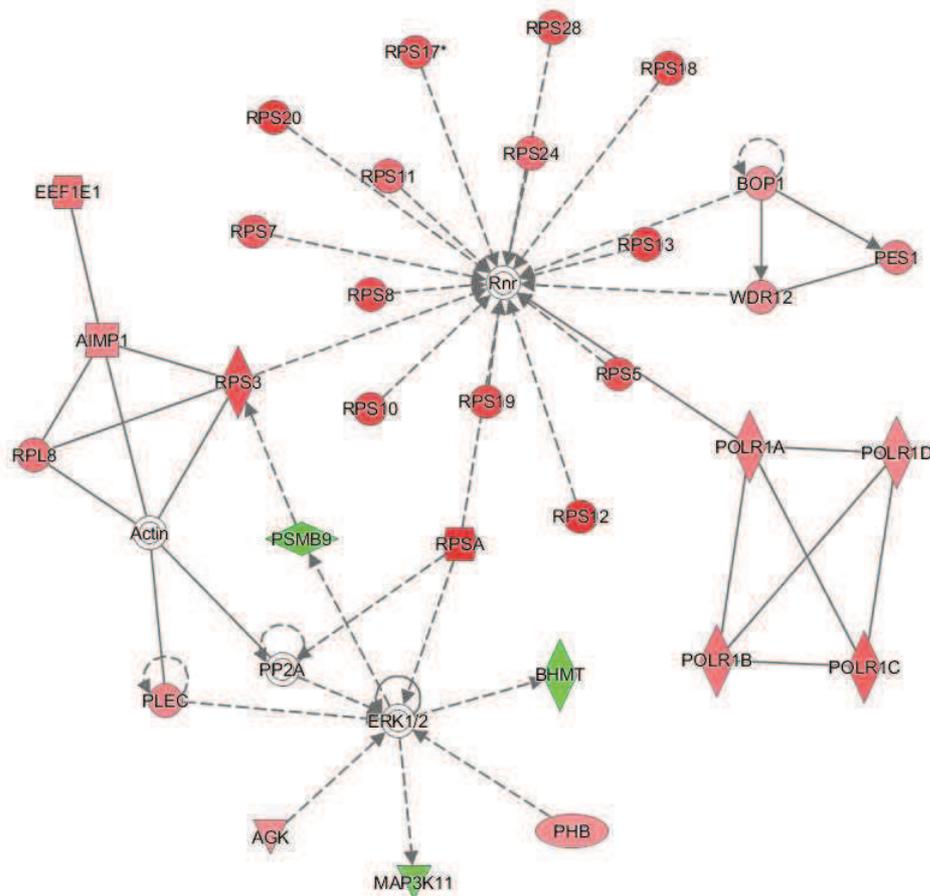


Abb. 4.3.6 II: RNS-posttranskriptionale Modifikation, Herz-Kreislauf-Krankheit und Entwicklungsstörung

Das Netzwerk RNS-posttranskriptionale Modifikation, Herz-Kreislauf-Krankheit und Entwicklungsstörung beinhaltet 28 induzierte und drei reprimierte Gene. Die zentralen Gene im Netzwerk sind RNR (Ribonukleotidreduktase) und ERK1/2 („Extracellular-signal Regulated Kinases“), welche beide nicht signifikant reguliert vorliegen. Von den im Netzwerk induzierten Genen kodieren 16 Gene ribosomale Proteine.

## Experimente und Ergebnisse

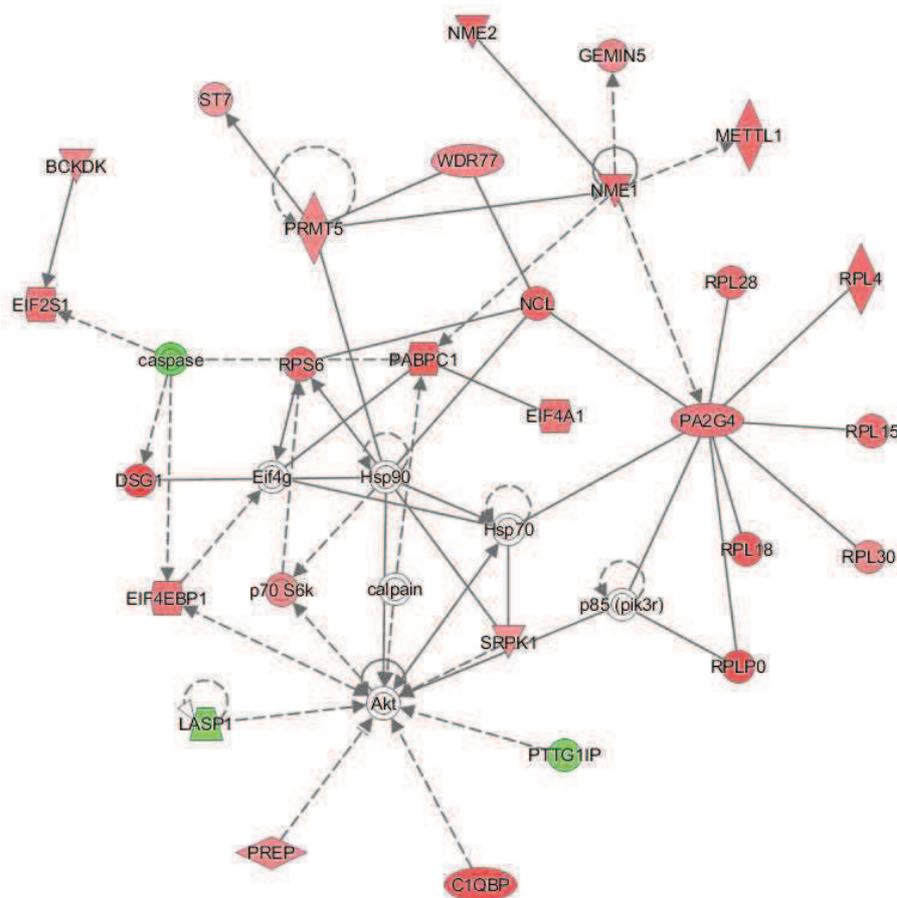


Abb. 4.3.6 I2: Protein-Synthese, DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur sowie Genexpression

Das Netzwerk Protein-Synthese, DNS-Replikation, Rekombination und Reparatur sowie Genexpression beinhaltet 26 induzierte und drei reprimierte Gene. Die zentralen Gene im Netzwerk sind AKT (kodiert eine Serin-Threonin-Proteinkinase B), HSP90 („Heat shock Protein 90“), PA2G4 („Proliferation-Associated 2G4“, kodiert RNS-bindendes Protein) und NME1 („NME/NM23 Nucleoside Diphosphate Kinase 1“), wobei die ersten beiden nicht signifikant reguliert vorliegen und die beiden letztgenannten signifikant induziert sind. In diesem Netzwerk kodieren sieben der induziert regulierten Gene ribosomale Proteine.



## Experimente und Ergebnisse

TRANSFAC®-Datenbank auf E-box-Motive und weitere bekannte Myc-Motive untersucht. Es wurde hierzu eine spezielle Motiv-Matrix erstellt, die alle bekannten Myc-Motive und das E-box-Motiv enthielt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls nicht regulierte Gene auf diese Motive untersucht. Auch wurde diese spezielle Motiv-Matrix mit Matrizen verglichen, die lediglich aus E-box-Motiven beziehungsweise aus Myc- und Max-Motiven bestehen.

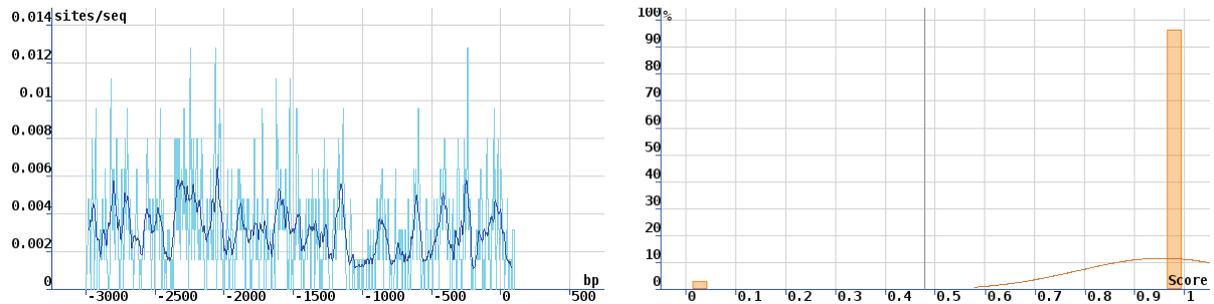


Abb. 4.4.1 A: TRANSFAC®-Analyse aller in sechs und zwölf Monate alten transgenen Tieren regulierten Gene mit dem Promotorbereich -3Kb/+100b und einer E-box-Motiv-Matrix

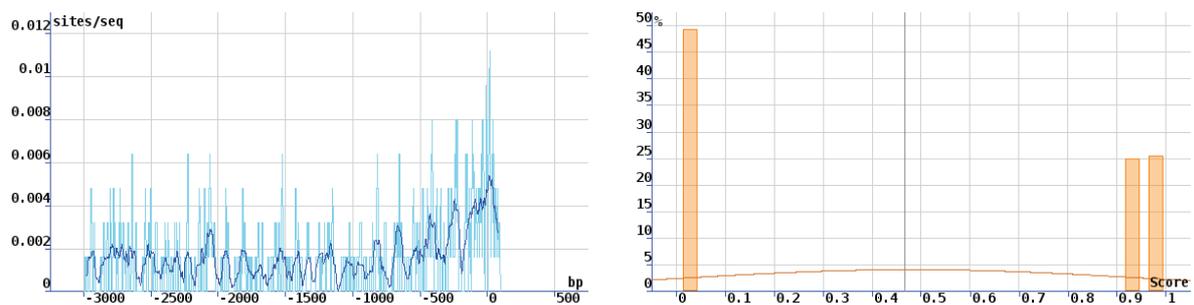


Abb. 4.4.1 B: TRANSFAC®-Analyse aller in sechs und zwölf Monate alten transgenen Tieren regulierten Gene mit dem Promotorbereich -3Kb/+100b und einer Myc/Max-Motiv-Matrix

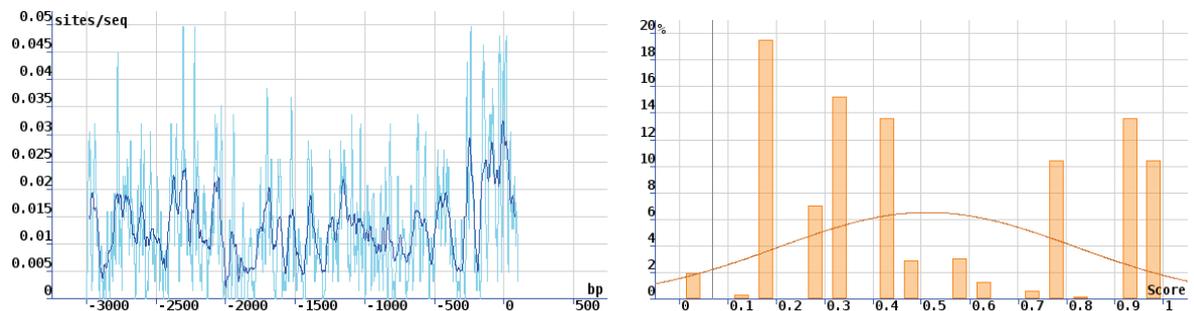


Abb. 4.4.1 C: TRANSFAC®-Analyse aller in sechs und zwölf Monate alten transgenen Tieren regulierten Gene mit dem Promotorbereich -3Kb/+100b und der speziell entworfenen Motiv-Matrix

## Experimente und Ergebnisse

Wie anhand der Abbildungen ersichtlich wird, liegen die Myc/Max-Motive überwiegend im Bereich der Transkriptionsstartsequenz, während die E-box-Motive auf dem gesamten untersuchten Promotorbereich verteilt liegen. Bei der speziell entworfenen Motiv-Matrix befinden sich die meisten Motive ebenfalls im Bereich des Transkriptionsstartes. Ferner ist festzustellen, dass die Treffer pro Sequenz mit über 0,03 sites/sequence bei der speziell entworfenen Motiv-Matrix deutlich höher sind als bei dem E-box-Motiv (über 0,006 sites/sequence) und dem Myc/Max-Motiv (unter 0,006 sites/sequence). Die speziell entworfene Motiv-Matrix eignet sich folglich am besten, um mögliche neue Myc-Target Gene zu identifizieren.

Es zeigte sich, dass 66 % ( $\cong$  58) der regulierten Gene in der Dysplasie ein oder mehrere Motive im Promotorbereich enthalten. Von diesen Genen wurden bereits 17 Gene als Myc-Target Gene beschrieben (siehe [www.myccancergene.org](http://www.myccancergene.org)). Es wurden für weitere Untersuchungen die Gene Mybbp1a, Fhit, Rpl10a, Skp1a, Tfdp1, Nhp2, Bola2, Rps19 und Rps7 ausgewählt, da diese Gene bei der MATCH<sup>TM</sup>-Analyse die größte Übereinstimmung mit den bekannten Motiven besitzen. Bei der Promotoranalyse der zwölf Monate alten Tiere, also der Tiere mit einem HCC, wiesen 358 Gene ein oder mehrere Motive auf. Für die weitere Auswahl wurden bei der Analyse nur die Gene betrachtet, die bereits im Zusammenhang mit Krebs stehen. Diese Analyse umfasste 188 Gene, wovon 174 ausschließlich bei Tieren mit HCC exprimiert werden. Von diesen weisen 95 % ( $\cong$  165 Gene) ein oder mehrere Motive auf. Für weitere Untersuchungen wurden hieraus die folgenden Gene ausgewählt: C9 (complement component 9), Cfh (complement component factor h), Gas6 (growth arrest specific 6), Ly6d (lymphocyte antigen 6 complex, locus D), Pdgfa (platelet-derived growth factor, alpha), Plat (plasminogen activator, tissue), Ramp2 (receptor (calcitonin) activity modifying protein 2), Rpl23 (ribosomal protein L23), Slc10a1 (solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1), Tmem97 (transmembrane protein 97) und Vill1 (villin 1).

### 4.5 EMSA-Analyse der möglichen Myc-Target Gene

Der „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) oder „Band Shift Assay“ ermöglicht den Nachweis von DNS- oder RNS-bindenden Proteinen wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren.

Die Ergebnisse des EMSA wurden durch Kompetition oder, falls möglich, durch einen spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Protein spezifiziert. Bei dem Kompetitions-Assay

## Experimente und Ergebnisse

wurde mit einer 100-fachen Konkurrenz einer mutierten Sonde und einer identischen DNS-Sonde gearbeitet. Des Weiteren wurde statt des spezifischen c-Myc-Antiserums das Protein c-Myc zu dem Kernextrakt gegeben. Als weitere Kontrolle wurden die DNS-Sequenzen mit einem spezifischen Antikörper gegen Max, den Heterodimerpartner von c-Myc, inkubiert. Es wurde eine DNS-Bindung der Gene Mybbp1a, Rpl10a, Bola2, Fhit, Nhp2, Skp1a, Tfdp1, Rps7, Rps19, C9, Cfh, Gas6, Ly6d, Pdgfa, Plat, Ramp2, Rpl23, Slc10a1, Tmem97 und Vill mit dem Transkriptionsfaktor c-Myc untersucht. Alle Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die Supershift-Banden sind hierbei besonders hervorgehoben.

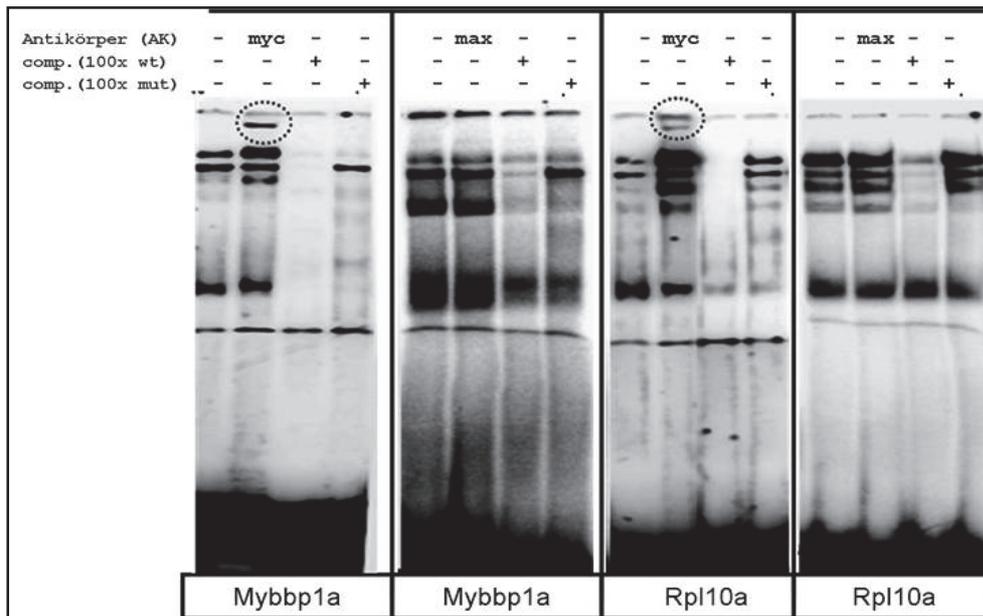


Abb. 4.5 A: EMSA der Gene Mybbp1a und Rpl10a mit c-Myc-Antiserum und Kontrollinkubation mit anti-Max-Antikörper

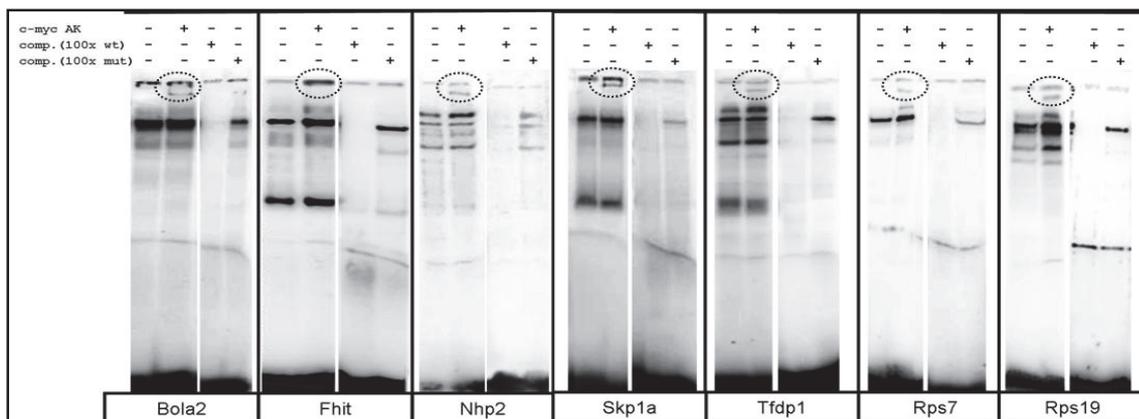


Abb. 4.5 B: EMSA der Gene Bola2, Fhit, Nhp2, Skp1a, Tfdp1, Rps7 und Rps19 mit c-Myc-Antiserum

## Experimente und Ergebnisse

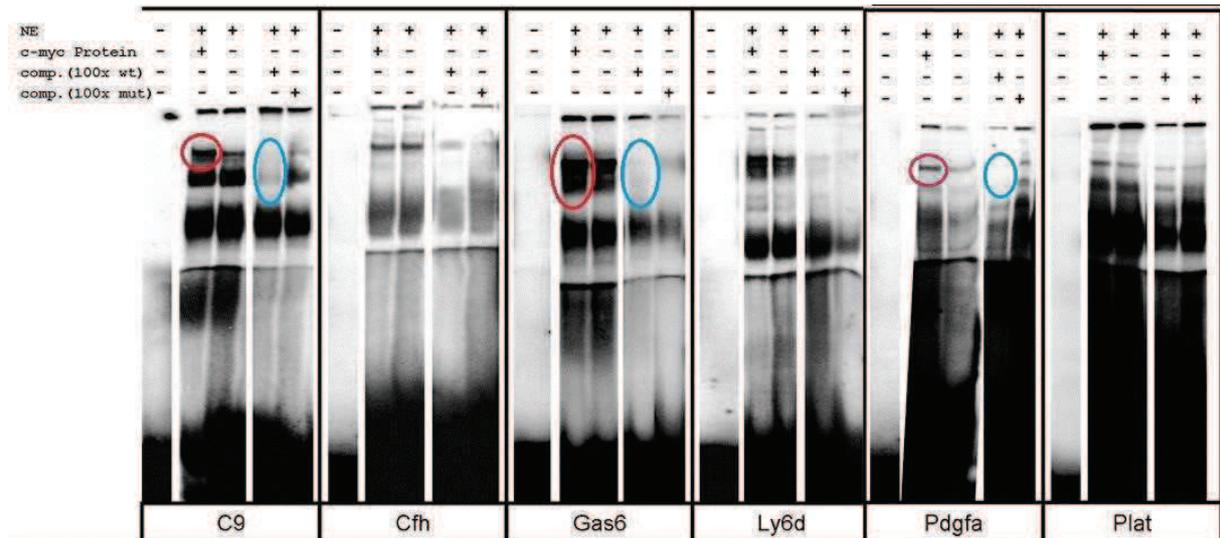


Abb. 4.5 C: EMSA der Gene C9, Cfh, Gas6, Ly6d, Pdgfa und Plat mit zusätzlichem c-Myc-Protein

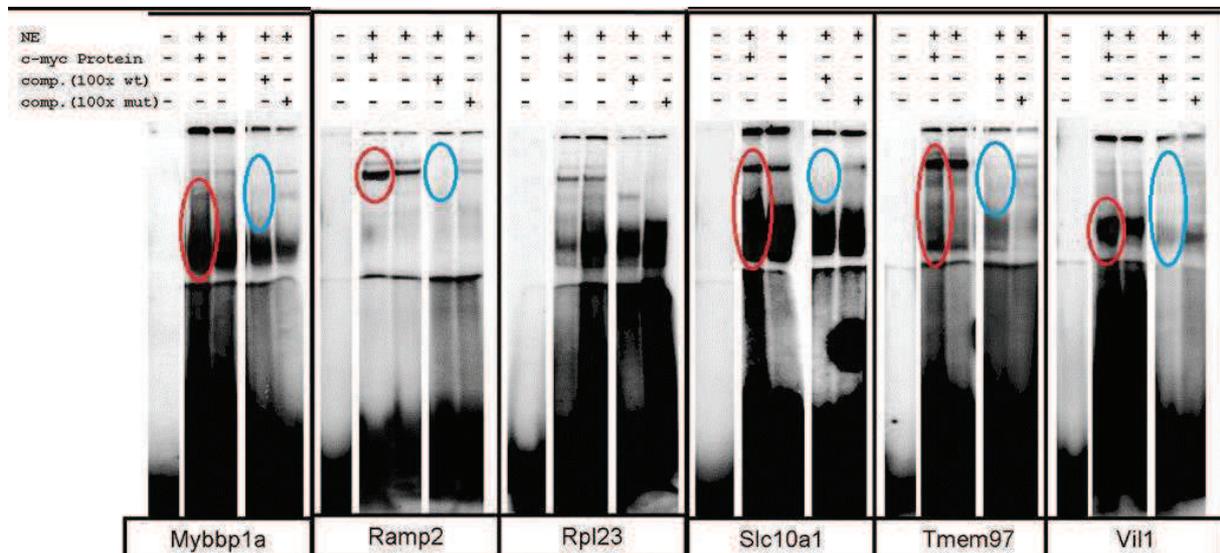


Abb. 4.5 D: EMSA der Gene Mybbp1a, Ramp2, Rpl23, Slc10a1, Tmem97 und Vill1 mit zusätzlichem c-Myc-Protein

Die Kontrollinkubation mit einem anti-Max-Antikörper zeigte, dass es, im Gegensatz zu der analogen Inkubation mit einem Antiserum gegen c-Myc, zu keinem Supershift kommt. Der anti-Max-Antikörper konnte zuvor in anderen EMSA-Assays als funktionaler Max-spezifischer Antikörper identifiziert werden.

Die Untersuchungen mit dem c-Myc-Antiserum konnten eine Bindung der Gene Bola2, Mybbp1a, Nhp2, Rpl10a, Rps7, Rps19, Skp1a und Tfdp1 mit dem Transkriptionsfaktor

## Experimente und Ergebnisse

c-Myc feststellen. Der EMSA-Assay für das Gen Fhit konnte keinen eindeutigen Supershift zeigen, jedoch sind im Vergleich zu der Spur ohne Antiserum eine intensive Bande im Bereich der Geltasche und eine Kompetition zu erkennen. Die Untersuchungen ohne c-Myc-Antiserum zeigten, dass die Gene C9, Gas6, Pdgfa, Ramp2, Slc10a1, Tmem97 und Vill positiv im Wettbewerbsversuch sind (siehe blaue Markierung in den Abbildungen 4.5 C und D). Des Weiteren zeigte sich für diese Gene eine intensivere Bande in der Spur mit c-Myc-Protein als in der vergleichbaren Spur ohne zusätzliches Protein (siehe rote Markierung in den Abbildungen 4.5 C und D). Die Gene Ly6d, Plat und Rpl23 wiesen Unterschiede in den Shiftbanden der einzelnen Kontrollen auf.

### 4.6 qRT-PCR-Analyse

Zur Validierung der Microarray-Analyse wurden qRT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde cDNS des Ausgangsmaterials für die Microarray-Analyse untersucht. Für die qRT-PCR-Analysen wurden die Fold Change berechnet, welche der unten aufgeführten Tabelle zu entnehmen sind. Alle Ergebnisse waren statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Die Ergebnisse für zwölf Monate alte Tiere wurden zusätzlich in einem Diagramm dargestellt.

Tab. 4.6 A: Fold Change-Ergebnisse der Validierung der Microarray-Daten mit qRT-PCR

Analyse Befund Gen	Microarray-Analyse			qRT-PCR		
	Transgen 2 Monate	Dysplasie 6 Monate	Tumor 12 Monate	Transgen 2 Monate	Dysplasie 6 Monate	Tumor 12 Monate
Aqp4	5,4	13,8	1,0	5,3	11,5	1,3
Bcap29	2,1	1,0	3,1	1,7	1,2	3,9
Bzw2	2,8	1,0	2,7	2,7	1,1	2,5
Col5a2	1,0	7,9	1,0	1,3	6,2	1,0
Dynll1	2,1	1,0	3,2	1,7	1,1	2,1
Itpr2	-2,3	1,0	2,3	-2,2	1,2	2,1
Mmp12	1,0	12,2	1,0	1,0	16,6	1,0
Nme1	1,0	2,3	1,0	-1,3	3,2	1,1
Nol5a	1,0	2,5	3,6	1,4	4,0	5,1

## Experimente und Ergebnisse

<b>Npm1</b>	2,1	2,0	2,6	2,3	3,2	3,9
<b>Rexo2</b>	2,1	1,0	2,4	1,8	1,1	2,9
<b>Rfc4</b>	2,6	3,3	1,0	3,3	4,6	1,6
<b>Rpl13a</b>	3,5	3,1	6,3	3,9	2,0	3,8
<b>Stmn1</b>	1,0	1,0	8,6	-1,0	1,9	8,5

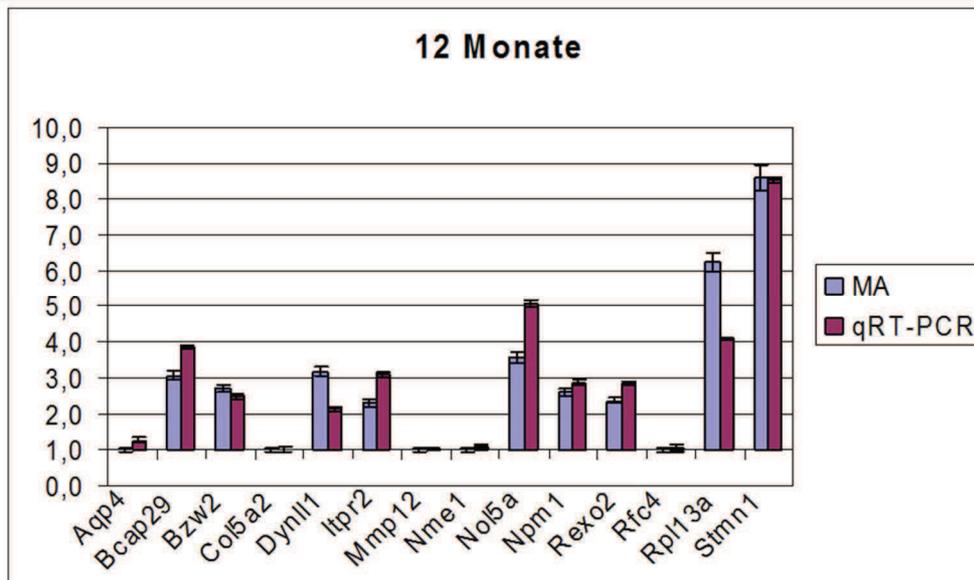


Abb. 4.6 A: Diagramm zu der Validierung der Microarray-Daten (MA) mit qRT-PCR für 12 Monate alte Tiere

Die Überprüfung der MA-Ergebnisse mittels qRT-PCR konnte die Reliabilität der MA-Daten feststellen. Die mittels qRT-PCR festgestellten Fold Change-Werte zeigten lediglich geringe Unterschiede zu den MA-Daten. Die größte Diskrepanz zwischen den MA-Ergebnissen ist bei den Genen Nme1, Nol5a, Npm1, Rfc4, Rpl13a und Stmn1 festzustellen. Bei diesen Genen handelt es sich um bekannte Myc-Target Gene (vergleiche hierzu: [www.myc-cancer-gene.org](http://www.myc-cancer-gene.org)).

Neben den zur Validierung durchgeführten qRT-PCR-Untersuchungen wurden die potentiellen Myc-Target Gene analysiert. Hierzu wurden wie zuvor das Ausgangsmaterial für die Microarray-Analyse sowie gelasertes Material aus Aat-Myc-transgenen Tieren mit unterschiedlichem histologischem Befund eingesetzt (gesundes Lebergewebe (grün), Dysplasien (gelb) und HCCs (rot)) und nicht-transgenes Material. Die berechneten Fold Change sind der unten aufgeführten Tabelle und den folgenden Diagrammen zu entnehmen. Alle Ergebnisse waren statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

## Experimente und Ergebnisse

Tab. 4.6 B: Fold Change-Ergebnisse der Microarray-Daten mit qRT-PCR

Analyse	Microarray-Analyse			qRT-PCR			qRT-PCR			
	Befund	Transgen	Dysplasie	Tumor	Transgen	Dysplasie	Tumor	Gesund	Dysplasie	Tumor
Gen	2 Monate	6 Monate	12 Monate	2 Monate	6 Monate	12 Monate				
<b>Bola2</b>	2,6	nc	2,4	1,3	3,5	-1,6	4	2,8	10	
<b>Mybbp1a</b>	nc	2,5	2,4	-1,3	1,2	1,1	1,7	2	3,8	
<b>Nhp2</b>	5	3,6	4,9	1,9	2,4	2,2	1,5	2,4	3,3	
<b>Rpl10a</b>	2,3	2,2	2,3	-1,3	1,5	1,3	2,2	1,7	5,9	
<b>Rps19</b>	3,2	2,4	2,4	-1,4	-1,0	2,4	4,7	3,5	10,1	
<b>Rps7</b>	2	nc	2,3	1,1	-2,2	3,6	2,3	2,5	5,4	
<b>Skp1a</b>	2,3	nc	nc	1,6	2,0	-1,1	-1,2	-1,7	1,4	
<b>Tfdp1</b>	2,2	2,3	nc	2,3	2,7	2,9	-1,1	-1,3	2,2	
<b>C9</b>	nc	nc	-31,6	/	/	1,9	/	/	-3,7	
<b>Cfh</b>	nc	nc	-2,4	/	/	1,2	/	/	-2,1	
<b>Gas6</b>	nc	nc	-3,6	/	/	-1,8	/	/	-3,2	
<b>Ly6d</b>	nc	nc	68,6	/	/	4,8	/	/	23,3	
<b>Pdgfa</b>	nc	nc	2,3	/	/	1,6	/	/	2,7	
<b>Plat</b>	nc	nc	86,4	/	/	9,9	/	/	97,2	
<b>Ramp2</b>	nc	nc	-2,5	/	/	2,5	/	/	-6,1	
<b>Rpl23</b>	nc	nc	2,8	/	/	1,0	/	/	1,7	
<b>Slc10a1</b>	nc	nc	-5,1	/	/	2,2	/	/	-5,1	
<b>Tmem97</b>	nc	nc	2,5	/	/	1,1	/	/	1,2	
<b>Vil1</b>	nc	nc	27,4	/	/	7,6	/	/	57,9	

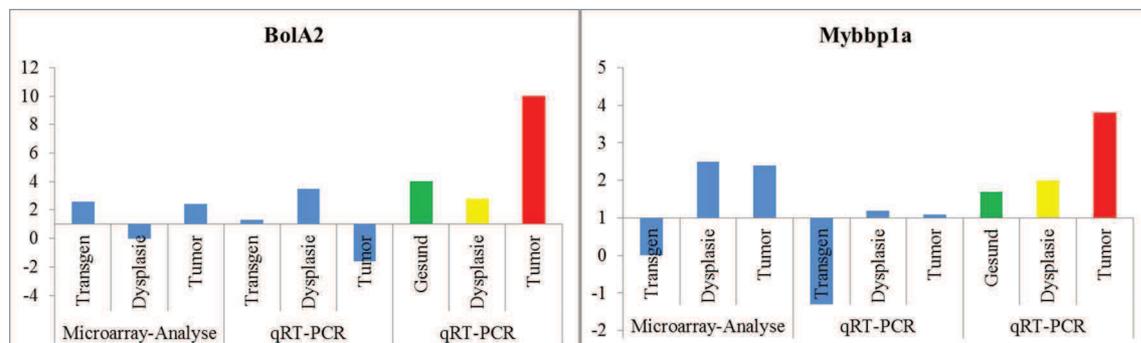


Abb. 4.6 B und C: Diagramm der Microarray-Daten mit qRT-PCR für Bola2 (B) und Mybbp1a (C)

## Experimente und Ergebnisse

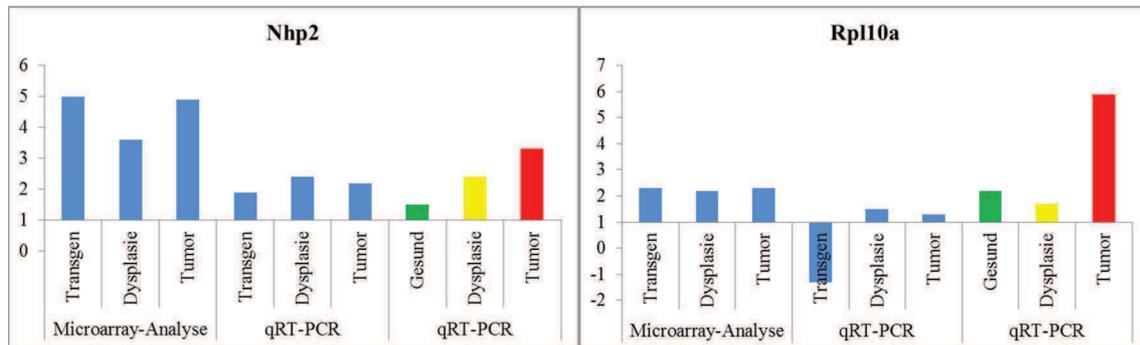


Abb. 4.6 D und E:

Diagramm der Microarray-Daten mit qRT-PCR für Nhp2 (D) und Rpl10a (E)

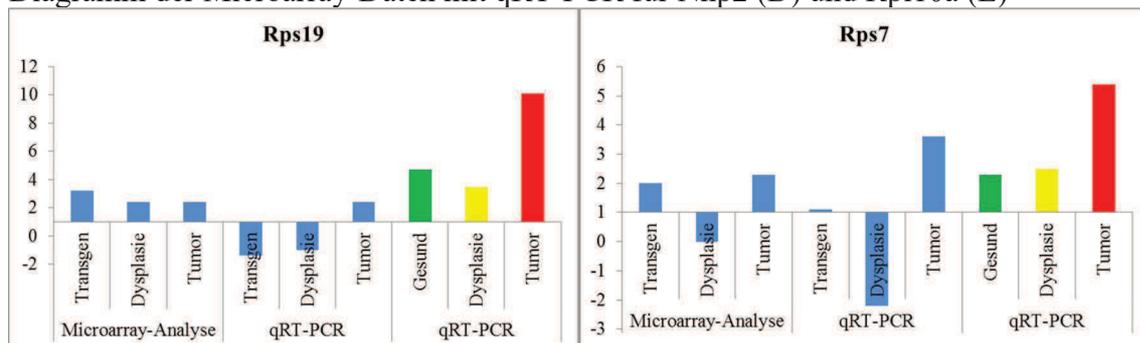


Abb. 4.6 F und G:

Diagramm der Microarray-Daten mit qRT-PCR für Rps19 (F) und Rps7 (G)

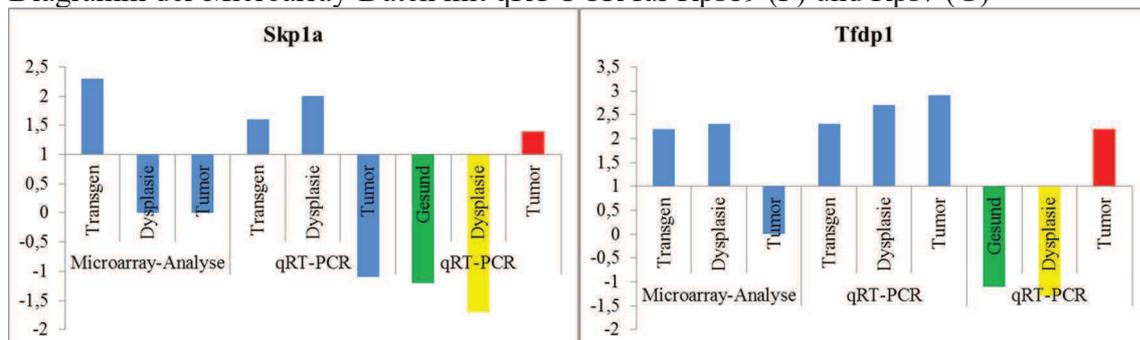


Abb. 4.6 H und I:

Diagramm der Microarray-Daten mit qRT-PCR für Skp1a (H) und Tfdp1 (I)

Bis auf wenige Ausnahmen entsprechen die qRT-PCR-Ergebnisse den Microarray-Daten. Die größte Diskrepanz zwischen qRT-PCR und Microarray-Daten ist für die Gene Skp1a und Tfdp1 für das gelaserte Material festzustellen. So ist in den MA-Daten keine signifikante Expression für das Gen Skp1a in Dysplasie und Tumor zu erkennen, die qRT-PCR-Ergebnisse zeigen eine induzierte bzw. reprimierte Expression für dieses. Des Weiteren sind für dieses Gen auch die qRT-PCR-Ergebnisse abweichend. So zeigt das gelaserte Material für gesundes und dysplastisches Gewebe eine Repression, während in zwei und sechs Monate alten Tieren eine Induktion stattfindet. Für das Gen Tfdp1 entsprechen die qRT-PCR-

## Experimente und Ergebnisse

Ergebnisse von zwei und sechs Monate alten Tieren den MA-Daten. Für die zwölf Monate alten Tiere wurde im MA kein Unterschied in der Expression zur Kontrolle festgestellt, die qRT-PCR-Daten weisen hier ihr Expressionsmaximum auf. Die Daten aus der qRT-PCR mit dem gelaserten Material weisen keine Übereinstimmungen mit den MA-Daten auf, demnach ist das Gen *Tfdp1* in gesundem transgenem und in dysplastischem Gewebe herunterreguliert, während es im Tumorgewebe hochreguliert ist.

Die EMSA-Experimente werden mit HGF-behandelten HepG2-Zellen verglichen. Da HGF-behandelte HepG2-Zellen im Western Blot (siehe 4.8 Western Blot-Analyse) eine erhöhte Myc-Expression zeigen, ist anzunehmen, dass auch die neu identifizierten Myc-Target Gene eine veränderte Expression aufweisen. Die qRT-PCR-Ergebnisse der HGF-behandelten HepG2-Zellen weisen zum Teil eine stark veränderte Expression im Vergleich zu unbehandelten HepG2-Zellen auf. Im Western Blot zeigten die HepG2-Zellen bei einer 12 h Behandlungszeit mit 80 ng HGF die stärkste Myc-Expression. Beim Vergleich dieser qRT-PCR-Ergebnisse mit den MA-Daten und den qRT-PCR-Ergebnissen der Aat-Myc-transgenen Mäuse sind in den Genen *SKP1A*, *TFDP1*, *C9*, *GAS6*, *RAMP2* und *SLC10A1* andere Expressionsverläufe als in den Aat-Myc-transgenen Mäusen zu erkennen. Die Gene *BOLA2*, *MYBBP1A*, *NHP2*, *PDGFA*, *RPL10A*, *RPS19*, *RPS7*, *TMEM97* und *VIL1* verhalten sich in ihrer Expression nahezu identisch mit den Aat-Myc-transgenen Mäusen.

Tab. 4.6 C: Fold Change-Ergebnisse der qRT-PCR von mit HGF-behandelten HepG2-Zellen

Dauer der Behandlung	1 h		2 h		4 h		12 h	
	40	80	40	80	40	80	40	80
<b>BOLA2</b>	-3,8	-1,6	-1,4	-1,2	-1,5	3,4	-1,0	10,4
<b>C9</b>	3,6	2,8	31,1	1,8	3,2	5,0	-1,7	2,6
<b>GAS6</b>	2,4	15,2	3,0	-1,2	3,8	2,1	1,9	4,4
<b>MYBBP1A</b>	-1,2	-2,6	1,3	-1,5	1,5	-4,6	3,0	2,0
<b>NHP2</b>	-2,2	3,4	1,3	3,3	1,6	6,4	1,0	2,2
<b>PDGFA</b>	5,2	30,7	6,5	1,6	3,7	3,7	1,3	3,3
<b>RAMP2</b>	-1,2	2,1	2,9	1,0	2,9	3,7	1,2	2,0
<b>RPL10A</b>	-1,5	1,8	1,4	10,3	1,8	3,3	1,0	5,8
<b>RPS19</b>	3,1	8,5	95,9	-32,2	1,3	-40,8	-1,1	66,0

## Experimente und Ergebnisse

<b>RPS7</b>	-2,2	2,3	1,2	1,8	1,1	2,9	1,2	3,3
<b>SKP1A</b>	-1,8	8,7	1,8	1,7	1,8	1,6	-3,1	5,4
<b>SLC10A1</b>	1,9	2,1	3,4	-1,4	2,1	2,6	3,2	2,4
<b>TFDP1</b>	1,1	8,9	3,6	4,4	7,6	7,3	1,1	1,5
<b>TMEM97</b>	1,2	4,4	5,6	2,0	5,3	5,5	1,3	1,9
<b>VIL1</b>	5,1	3,8	4,8	1,9	5,0	8,5	1,1	4,9

### 4.7 Zellzyklus

Die Zellzyklusanalyse wurde an HepG2-Zellen durchgeführt, die weniger als 10-mal passagiert wurden. Nachdem die Zellen für 24 h in einem Mangelmedium gehalten wurden, was eine Synchronisation der Zellen in der G0/G1-Phase bewirkt, wurden die Zellen mit 40 bzw. 80 ng/ml rhHGF in DMEM behandelt. Nach 12 h, 24 h und 48 h Behandlungszeit wurden die Zellen für die Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer vorbereitet. Wie in den folgenden Diagrammen zu sehen ist, führt die HGF-Behandlung nach 24 h und 48 h zu einer Anreicherung von Zellen in der G0/G1-Phase, während nach 12 h die Behandlung mit HGF noch keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle aufweist. So wurden die folgenden durchschnittlichen prozentualen Verteilungen in den einzelnen Zellzyklusphasen dokumentiert (Tab. 4.7).

Tab. 4.7: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse als durchschnittliche prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen

12 h HGF	G0/G1	S	G2	24 h HGF	G0/G1	S	G2	48 h HGF	G0/G1	S	G2
Kontrolle	57,3	28,9	13,9	Kontrolle	52,8	40,1	7,1	Kontrolle	63,9	24,7	11,4
40 ng/ml HGF	58,9	25,7	15,4	40 ng/ml HGF	81,1	12,2	7,2	40 ng/ml HGF	88,2	11,6	4,8
80 ng/ml HGF	58,3	24,8	16,9	80 ng/ml HGF	85,5	7,4	7,1	80 ng/ml HGF	89,6	3,7	6,7

## Experimente und Ergebnisse

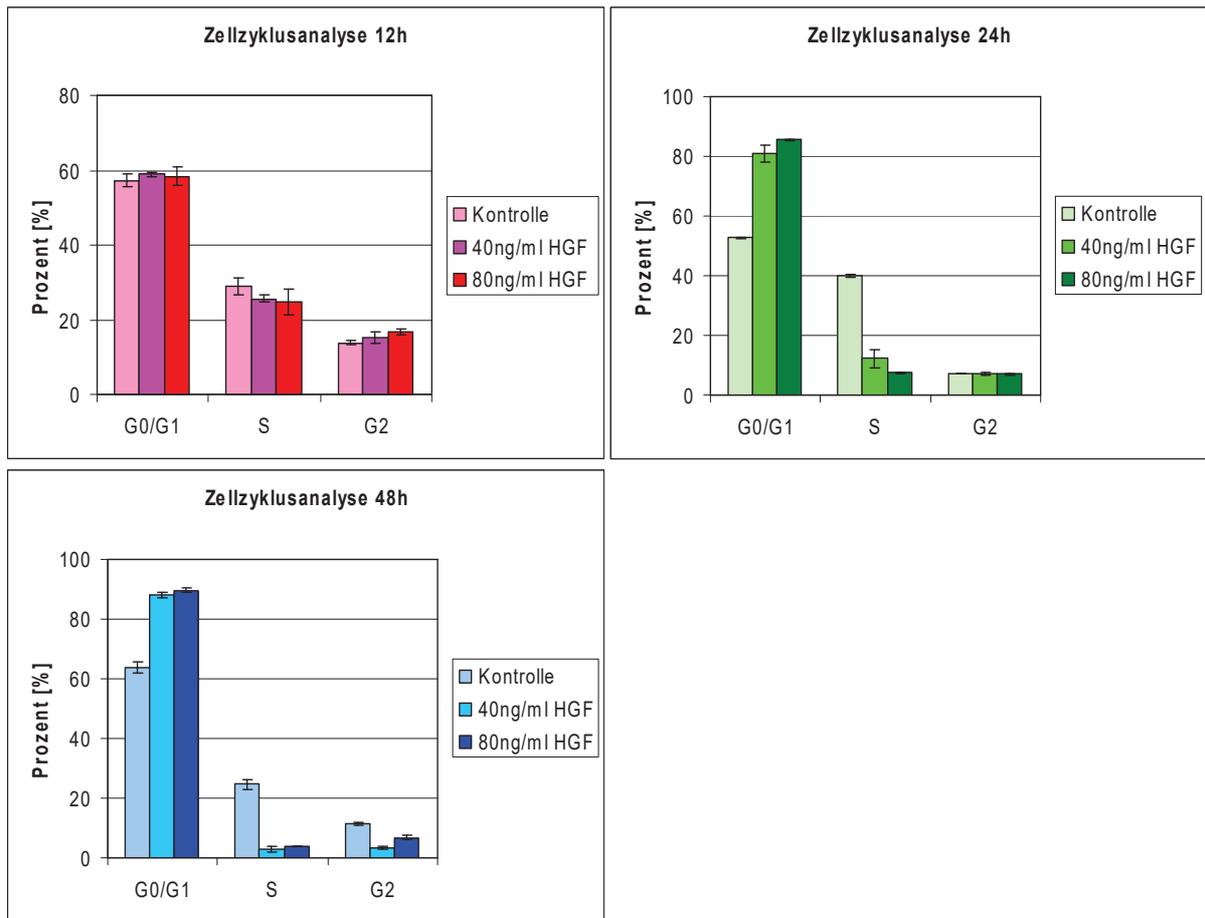
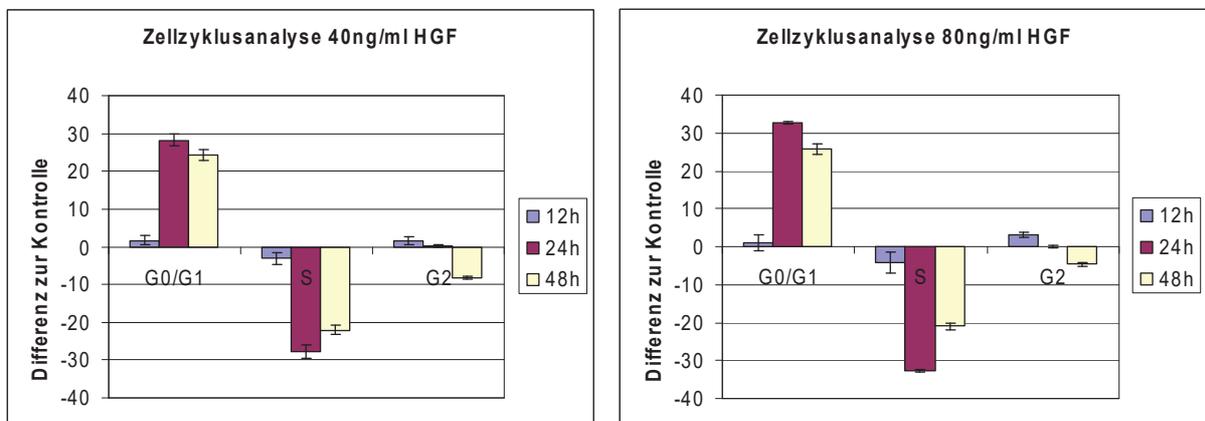


Abb. 4.7 A, B und C: Diagramm der Zellzyklusanalyse nach 12 h (A), 24 h (B) und 48 h (C) Behandlung mit HGF

Wie anhand der folgenden Diagramme ersichtlich ist, weisen die verschiedenen HGF-Konzentrationen nach 24 h und 48 h signifikante Unterschiede zur Kontrolle auf. Die Differenz zur Kontrolle nach 12 h Behandlung mit HGF weist für keine Zellzyklusphase eine statistische Signifikanz auf.



## Experimente und Ergebnisse

Abb. 4.7 D und E: Diagramm der Zellzyklusanalyse nach HGF-Konzentrationen (40 ng/ml D; 80 ng/ml E) als Differenz zur Kontrolle

### 4.8 Western Blot-Analyse

Werden HepG2-Zellen mit HGF stimuliert, so zeigt sich im Western Blot eine signifikant erhöhte Myc-Expression im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen.

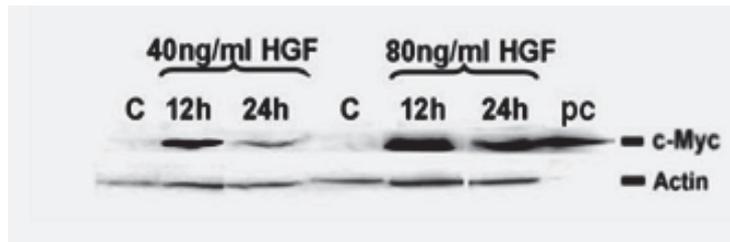


Abb. 4.8 A: Western Blot mit Proteinextraktproben aus HGF-stimulierten HepG2-Zellen sowie Myc-Protein als Positivkontrolle (pc) und Proteinextrakt aus nicht stimulierten HepG2-Zellen (C)

Zur Kontrolle der Überexpression von Myc wurden auch die zwei, sechs und zwölf Monate alten Tiere sowie Proteinextrakte aus Gewebe mit HCC auf ihre Myc-Expression untersucht.

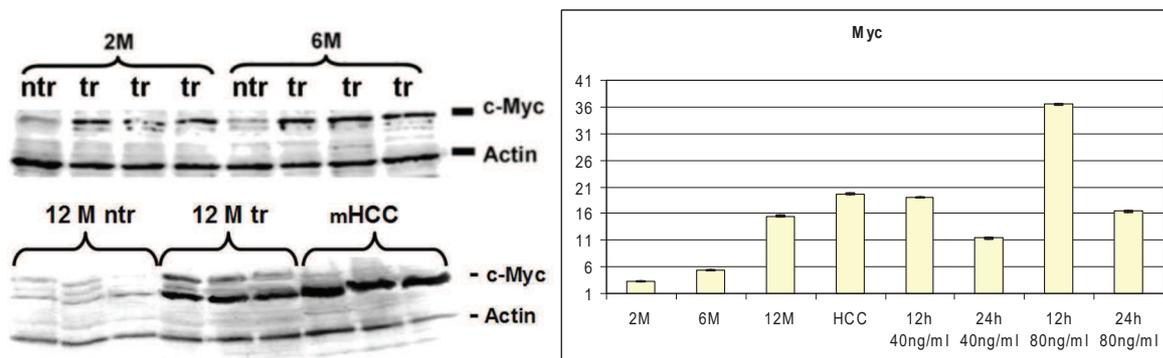


Abb. 4.8 B, C und D: (B) Western Blot mit den Proteinextraktproben von zwei und sechs Monate alten Tieren (2M, 6M), (C) Western Blot mit den Proteinextraktproben von zwölf Monate alten Tieren (12M) und HCC-Gewebe (mHCC), (D) Diagramm zu allen Myc-Western Blots (D)

Es konnte in allen Proteinextrakten aus transgenem Gewebe eine signifikant erhöhte Expression des Proteins Myc im Vergleich zu nicht-transgenem Gewebe festgestellt werden.

Zum quantitativen und qualitativen Nachweis wurden weitere Proteine im Western Blot analysiert. Zur Analyse wurden Gesamtproteinextrakte und Kernextrakte aus Lebergewebe von Aat-Myc-transgenen Tieren und nicht-transgenen Tieren verschiedenen Alters und Krankheitsstadien auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) geblottet und auf dieser

## Experimente und Ergebnisse

durch spezifische Antikörper und eine anschließende Detektion nachgewiesen. Die Chemilumineszenz Reaktion wurde an der Kodak Station aufgenommen und densitometrisch ausgewertet. Für die densitometrische Auswertung wurde die Kodak 1D Image Analysis Software Version 3.5. benutzt. Die Housekeeping-Proteine (Aktin, Tubulin, Gapdh) wurden als Referenz der ermittelten Intensitäten der Proteine genutzt, um relative Expressionswerte dieser zu berechnen, welche in den folgenden Diagrammen neben den Fold Change-Werten dieser Gene aus den Microarray-Experimenten aufgetragen wurden.

Neben den zuvor genannten Proteinproben aus der Leber von Aat-Myc-transgenen Mäusen und Kontrolltieren wurde Gesamtproteinextrakt aus HGF-behandelten HepG2-Zellen und humanem HCC gewonnen.

Zunächst wurden alle Proteinproben auf ihre c-Myc-Expression untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Alter der Aat-Myc-transgenen Mäuse auch eine höhere Expression von c-Myc, wie auch zuvor in den Microarray-Daten ermittelt, festzustellen war. Neben einer erhöhten Expression bei den transgenen Mäusen konnte diese auch bei HGF-behandelten HepG2-Zellen ermittelt werden.

Bei beiden getesteten HGF-Konzentrationen ist die MYC-Expression nach 12 h höher als nach 24 h. Die Behandlung von HepG2-Zellen weist ferner nach einer Behandlungszeit von 12 h mit 80 ng/ml HGF in DMEM die höchste MYC-Expression auf.

Weitere Proteine, die im Western Blot analysiert wurden, waren Agt, ApoA4, Aqp4, Arg1, Casp3, Casp8, Casp9, Cebp $\alpha$ , Jun, Pla2g6, Ets2, Nr3c1 (GR), Gstm2, HNF1a, HNF1b, Foxa1 (HNF3 $\alpha$ ), Foxa3 (HNF3 $\gamma$ ), HNF4a, Hsp90aa1, Orm1, Trp53, Pck1, Pparg und Tbx3. Diese wurden in Proteinextrakten aus sechs und zwölf Monate alten transgenen Tieren (im Diagramm mit 6M, 12M aufgeführt) und Proteinextrakt aus humanem HCC (im Diagramm mit HCC beschriftet) untersucht. Im Diagramm sind neben den relativen Expressionswerten dieser auch die Fold Change-Werte der sechs und zwölf Monate alten transgenen Tiere aus den Microarray-Experimenten aufgetragen (im Diagramm abgekürzt mit MA 6M, MA 12M).

Die Antikörper für die Proteine Max, Cdk1 (Cdc2a) und Ctnnb1 (b-Catenin) konnten in den transgenen Tieren nicht, dafür aber im Proteinextrakt aus humanem HCC detektiert werden.

## Experimente und Ergebnisse

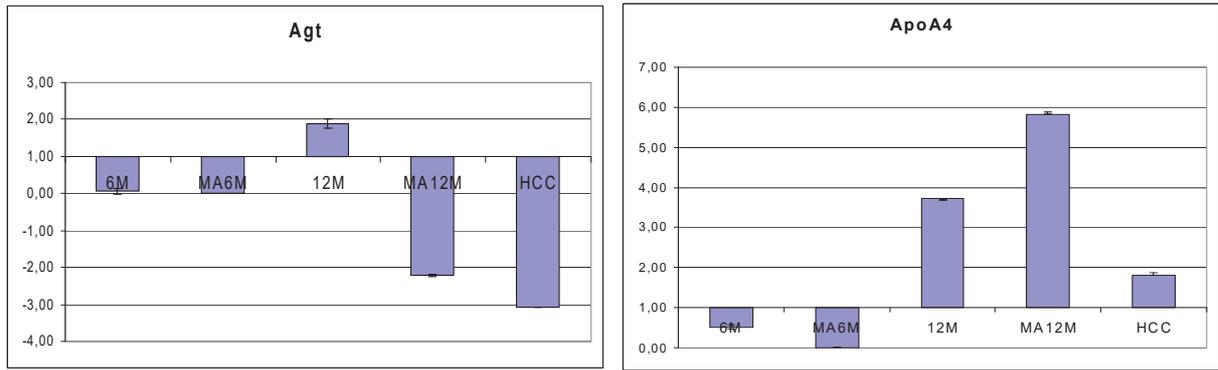


Abb. 4.8 E 1 und 2: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Agt (1) und ApoA4 (2)

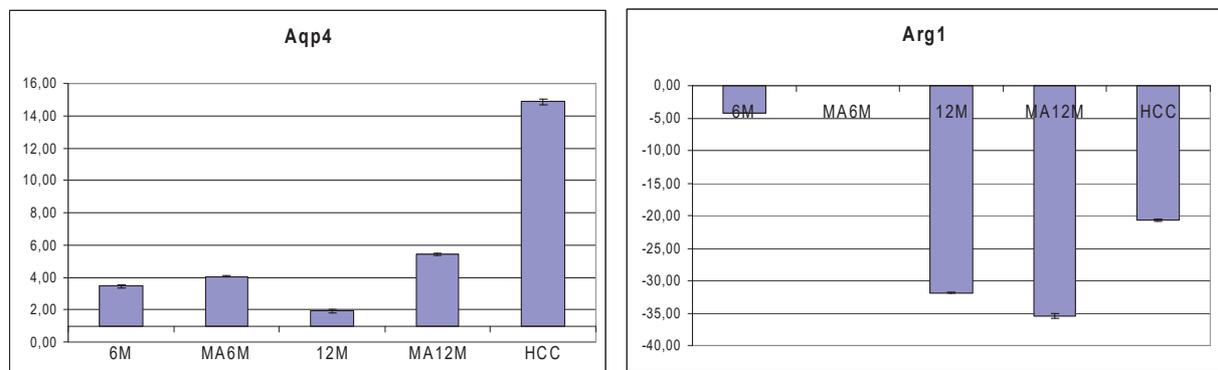


Abb. 4.8 E 3 und 4: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Aqp4 (3) und Arg1 (4)

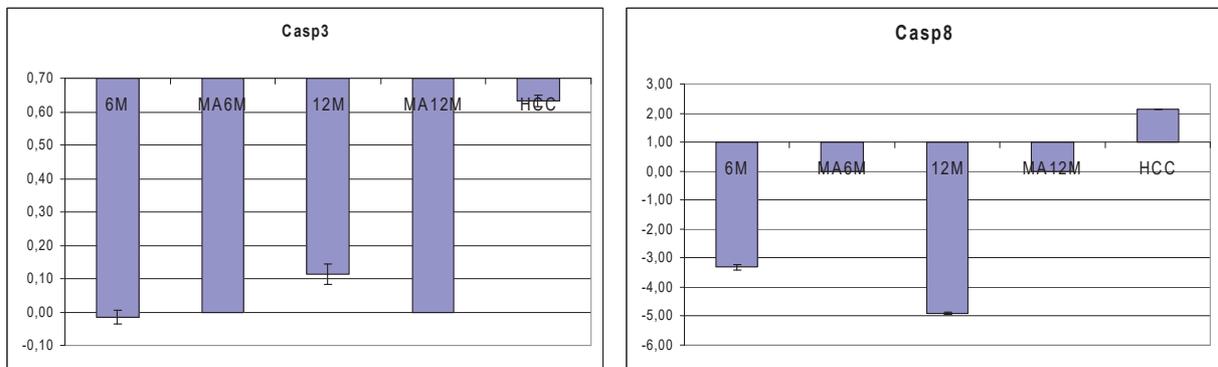


Abb. 4.8 E 5 und 6: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Casp3 (5) und Casp8 (6)

## Experimente und Ergebnisse

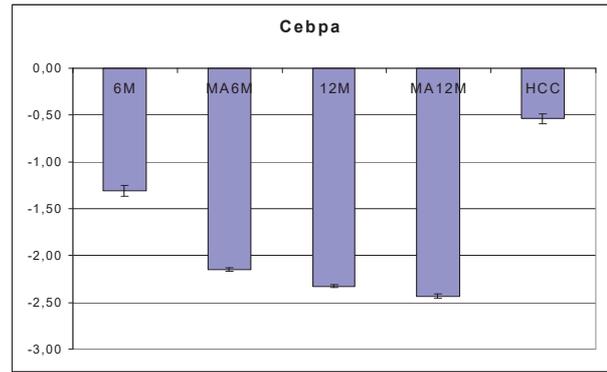
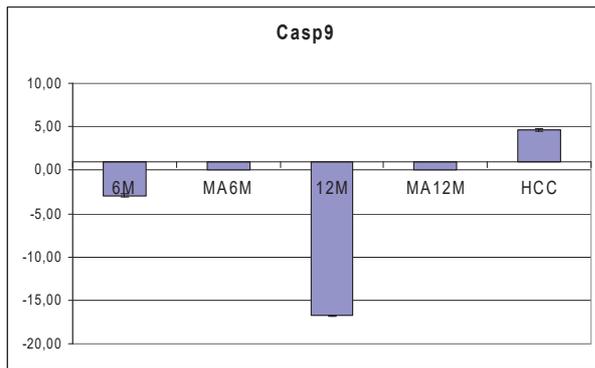


Abb. 4.8 E 7 und 8: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Casp9 (7) und Cebpa (8)

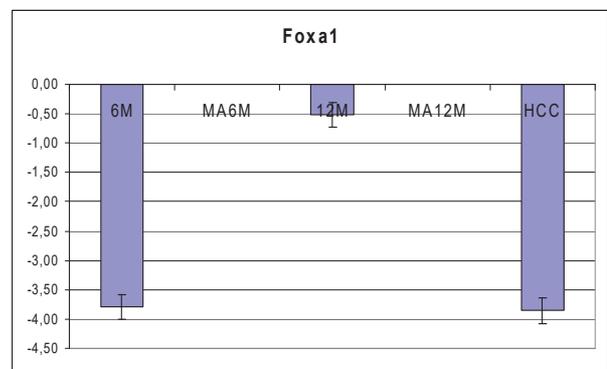
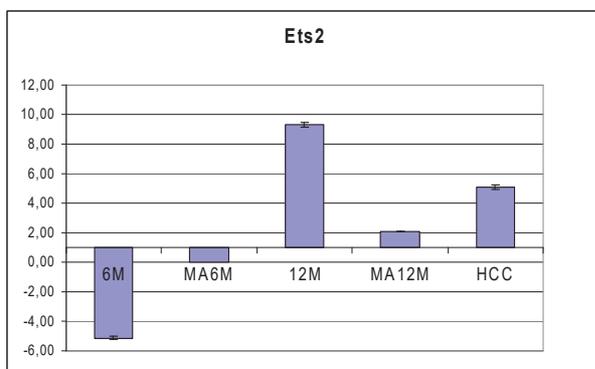


Abb. 4.8 E 9 und 10: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Est2 (9) und Foxa1 (10)

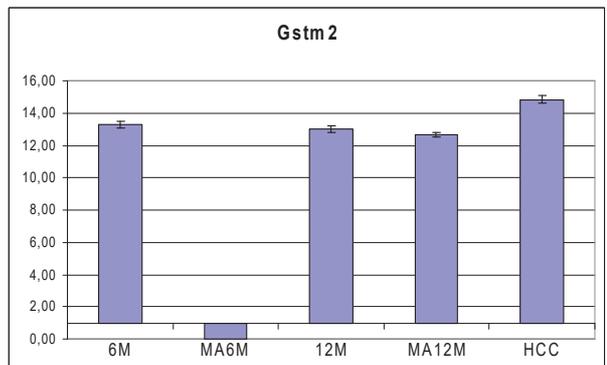
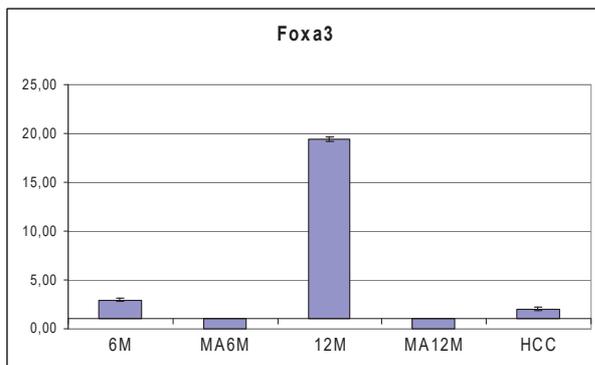


Abb. 4.8 E 11 und 12: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Foxa3 (11) und Gstm2 (12)

## Experimente und Ergebnisse

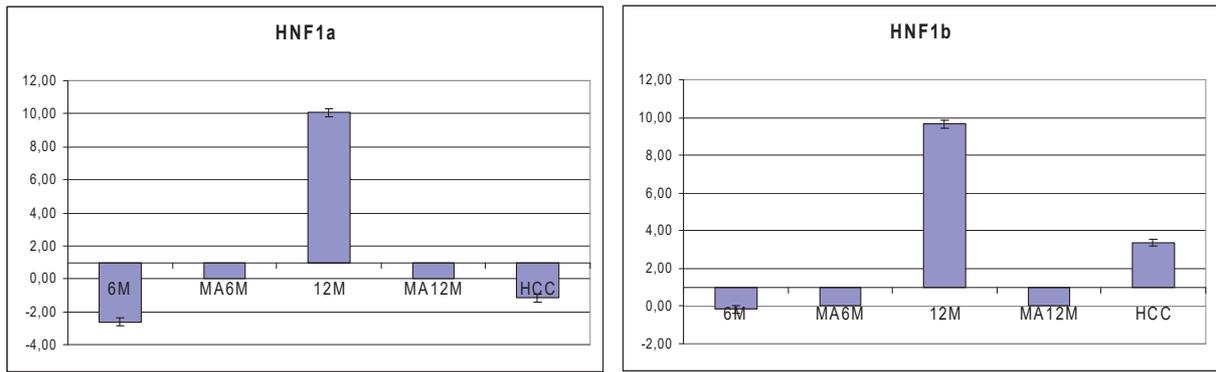


Abb. 4.8 E 13 und 14: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von HNF1a (13) und HNF1b (14)

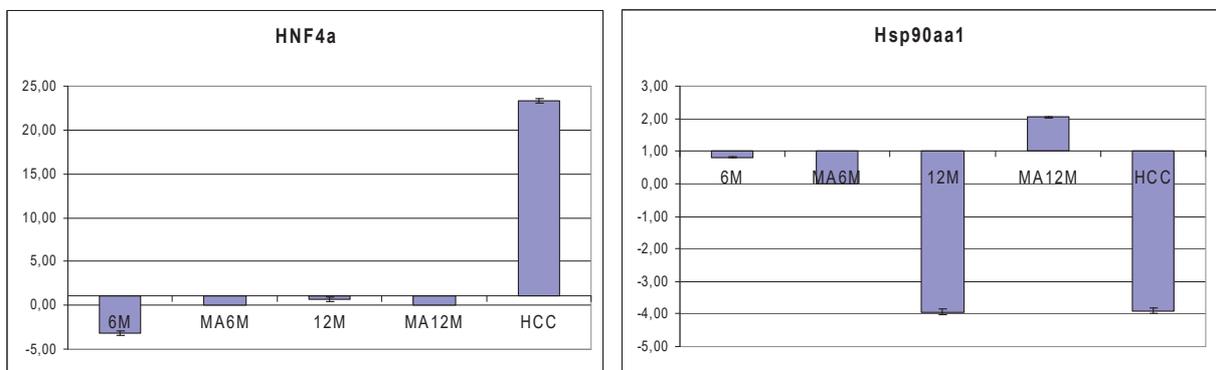


Abb. 4.8 E 15 und 16: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von HNF4a (15) und Hsp90aa1 (16)

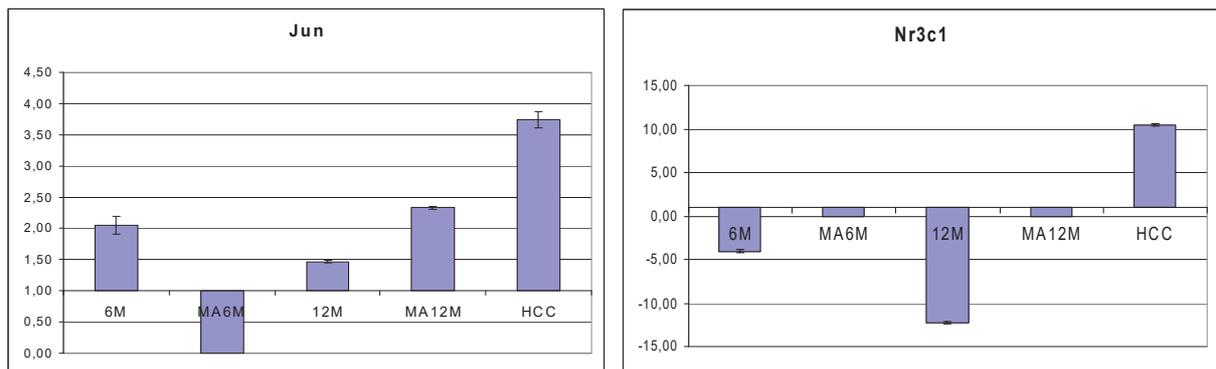


Abb. 4.8 E 17 und 18: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Jun (17) und Nr3c1 (18)

## Experimente und Ergebnisse

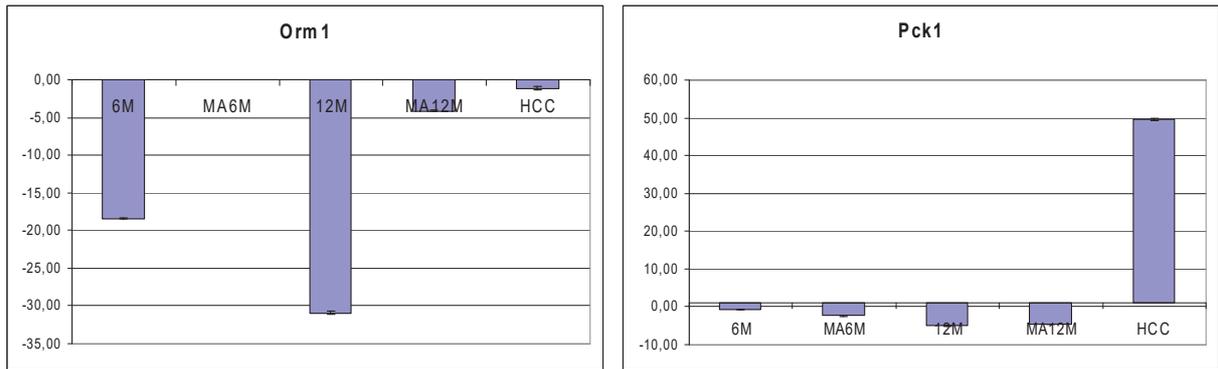


Abb. 4.8 E 19 und 20: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Orm1 (19) und Pck1 (20)

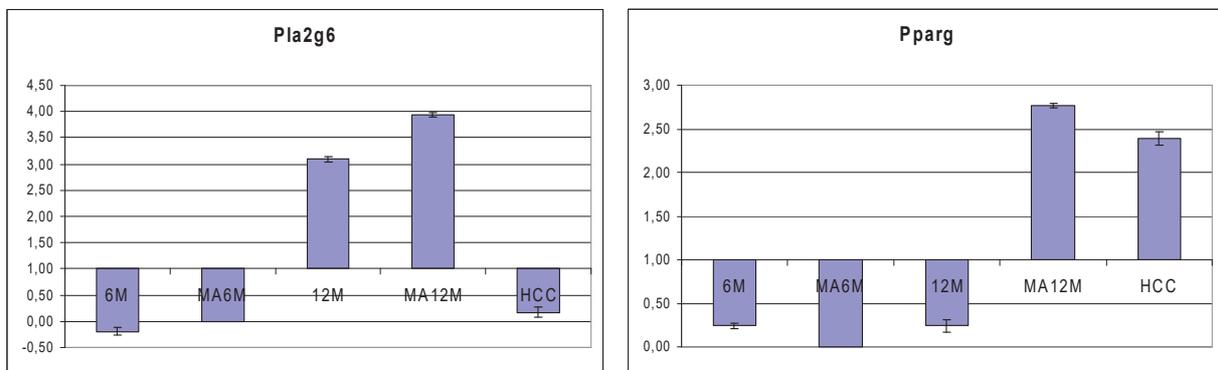


Abb. 4.8 E 21 und 22: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Pla2g6 (21) und Pparg (22)

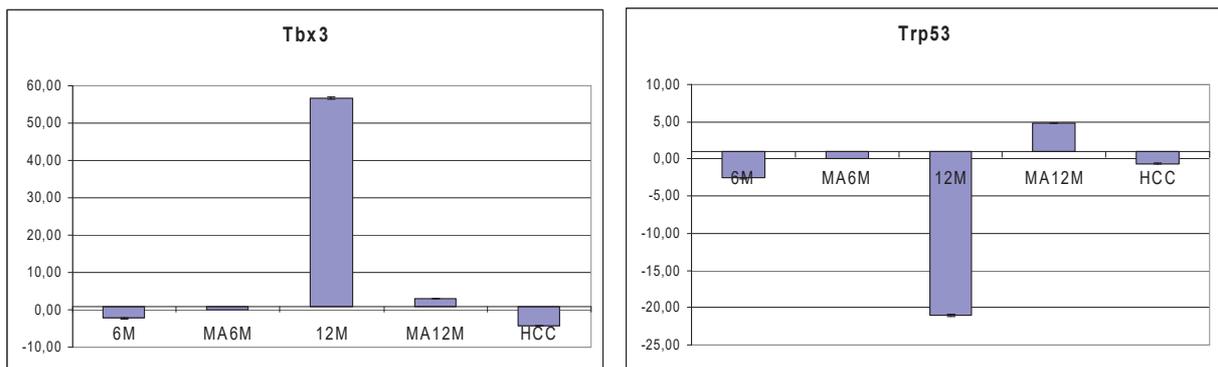


Abb. 4.8 E 23 und 24: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Tbx3 (23) und Trp53 (24)

## Experimente und Ergebnisse

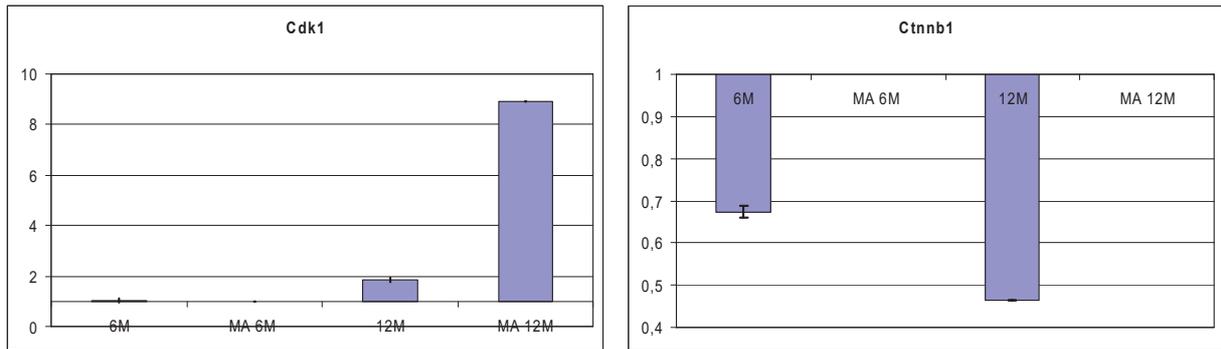


Abb. 4.8 E 25 und 26: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Cdk1 (25) und Ctnnb1 (26)

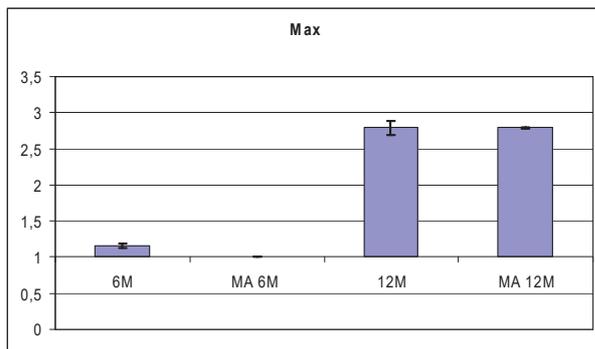


Abb. 4.8 E 27: Diagramm der relativen Expressionswerte aus dem Western Blot und Fold Change-Werte der Microarray-Experimente von Max

Eine vergleichbare Regulation der Genexpression und Proteinsynthese lässt sich für die Gene/Proteine Aqp4, Cebpa und Pck1 feststellen. Für Cebpa und Pck1 ist die Genexpression und Proteinsynthese in sechs und zwölf Monate alten Aat-Myc-transgenen Mäusen reprimiert, während diese bei Aqp4 induziert wurde. Eine teilweise vergleichbare Regulation der Genexpression und Proteinsynthese lässt sich für die Gene/Proteine ApoA4, Arg1, Cdk1, Ets2, Gstm2, Jun, Max, Orm1, Pla2g6 und Tbx3 feststellen. Da für diese Gene in den Microarray-Analysen kein signifikanter Unterschied zwischen sechs Monate alten transgenen und nicht-transgenen Tieren festgestellt werden konnte, wurden vorerst die Expressionswerte der Leberproben aus zwölf Monate alten transgenen Tieren verglichen. Die Gene/Proteine ApoA4, Cdk1, Ets2, Gstm2, Pla2g6, Jun, Max und Tbx3 weisen erhöhte, die Gene/Proteine Arg1 und Orm1 verminderte Expressionswerte auf. Die Gene Casp3, 8 und 9, Ctnnb1, Foxa1 und 3, HNF 1a, 1b und 4a sowie Nr3c1 weisen weder in sechs noch in zwölf Monate alten transgenen Tieren einen signifikanten Unterschied in ihrer Expression auf. Im Western Blot ist für Foxa3 eine verstärkte Proteinsynthese in sechs und zwölf Monate alten Tieren

## **Experimente und Ergebnisse**

festzustellen, ebenso für HNF1a und HNF1b in zwölf Monate alten Tieren. Die weiteren Proteine sind sowohl in sechs als auch in zwölf Monate alten transgenen Tieren reprimiert. Für die Gene/Proteine Agt, Hsp90aa1, Pparg und Trp53 ist die Proteinsynthese nicht entsprechend der Genexpression. So sind die Gene Hsp90aa1, Pparg und Trp53 induziert, die Proteinsynthese ist demgegenüber reprimiert. Das Gen Agt weist in zwölf Monate alten Tieren eine Repression auf, die Proteinsynthese hingegen ist induziert.

## Diskussion

### 5. Diskussion

#### 5.1 Exon Arrays

Die aus den Arrays erhaltenen Ergebnisse sind Genexpressionsraten, die als Verhältnis innerhalb eines Experimentes zueinander betrachtet werden. Da die Datenmengen von Microarray-Experimenten sehr groß sind, ist eine manuelle Verarbeitung schwierig, aus diesem Grund ist die Zuhilfenahme von rechnergestützten, bioinformatischen Methoden eine Notwendigkeit, die eine effiziente Analyse und Visualisierung der Datenmengen ermöglicht. Des Weiteren muss bei der Auswertung der Arrays bedacht werden, dass die Menge an Marker Substanz an jedem Spot mit der Menge des entsprechenden RNA-Transkripts korreliert. Dennoch ist es nicht möglich, eine Aussage über die absolute Menge des RNA-Transkripts zu tätigen, da die Aufbereitung der jeweiligen Proben mit ihren zahlreichen chemischen Reaktionen zu Nebeneffekten bei der Hybridisierung der Nukleotide führt (Batcheffekte). Aus diesem Grund wurde die Vorbereitung aller untersuchten Proben möglichst parallel im selben Labor durchgeführt. Dennoch ist anhand der Qualitätskontrollen ersichtlich, dass Batcheffekte bei den Exon Arrays aufgetreten sind, die mit unterschiedlichen Tagen des Wasch- und Färbe-Programms zusammenhängen (siehe auch Abb. 4.3.2 I). Da viele experimentelle Probleme auf dem ganzen Array oder der Samplevorbereitung auftreten können, ist es empfehlenswert, das Intensitäten Histogramm jedes Samples anzuschauen. Typischerweise hat ein Array mit zufällig ausgewählten Genen eine unimodale Verteilung (siehe auch Abb. 4.3.2 G). Falls mehrere Peaks vorhanden sind, deutet das auf einen Experimentierfehler hin. Das Intensitäten Histogramm, das in Abb. 4.3.2 G gezeigt wird, weist lediglich ein Maximum mit einem Abklingen nach rechts auf, welches der unimodalen Verteilung entspricht. Das Maximum weit links deutet auf geringe Intensitäten hin.

Nach Kalibrierung und Transformation der Expressionsdaten kann eine Mustererkennung erste Aussagen zu den Datensätzen geben. Zu solchen Visualisierungsmethoden gehören die PCA (principal component analysis; Hauptkomponentenanalyse) und verschiedene Clusteralgorithmen. Die für diese Arbeit erstellten PCA zeigen, dass die experimentellen Gruppen aus morphologisch gesundem, dysplastischem und tumorösem Lebergewebe Expressionsunterschiede aufweisen. Ebenso zeigen sich diese Unterschiede zwischen zwei, sechs und zwölf Monate alten transgenen Tieren. Die PCA zu den Exon Arrays zeigt weiterhin, dass sich das nicht-transgene Gewebe deutlich von dem transgenen Gewebe der unterschiedlichen Morphologien abtrennt. Die morphologisch unterschiedlichen Gewebe (gesund, Dysplasie und Tumor) lassen sich ebenfalls abtrennen, liegen aber von ihren

## Diskussion

Expressionsunterschieden enger beieinander. Werden lediglich die transgenen Gewebe in der PCA dargestellt, so trennen sich morphologisch gesundes Gewebe, dysplastisches Gewebe und Tumorgewebe stark voneinander ab.

Weitere Aussagen über funktionelle Verwandtschaften oder Koregulationen der Gene lassen sich über Clustermethoden erzielen. Der hierzu durchgeführte Algorithmus bedient sich der Annahme, dass funktionell verwandte oder koregulierte Gene ähnliche Expressionsmuster aufweisen, wodurch diese als Dendogramm berechnet und in einem hierarchischen Cluster als Gruppierung von Objekten dargestellt werden können.

### 5.1.1 Hierarchische Cluster

Das hierarchische Clustern für die Exon Arrays spiegelt das Ergebnis der PCA wider. So clustern die unterschiedlichen Gewebearten und das Kontrollgewebe (nicht-transgenes Gewebe) innerhalb ihrer Gruppe homogen. Wiederum sind zwischen den unterschiedlichen Gewebearten nur geringfügige Unterschiede ersichtlich, es wird aber eine starke Abtrennung zu dem Kontrollgewebe deutlich (nicht-transgenes Gewebe). Bei der Betrachtung der transgenen Gewebearten untereinander ist wie in der PCA eine strikte Abtrennung der verschiedenen Gewebe zu beobachten. Das hierarchische Clustern des Gesamtdatensatzes von zwei, sechs und zwölf Monate alten transgenen und nicht-transgenen Tieren zeigt, dass sich nur für zwölf Monate alte Tiere die Cluster der transgenen von den nicht-transgenen Tieren eindeutig abtrennen lassen. Bei zwei und sechs Monate alten Tieren lassen sich die transgenen von den nicht-transgenen Tieren nur in der Einzelbetrachtung voneinander separieren. Betrachtet man bei dem hierarchischen Cluster lediglich die Gene, die mit einem möglichen alternativen Spleiß Verhalten ausgewiesen wurden, so sind die hierarchischen Cluster vergleichbar mit dem Cluster der gesamten Exon Array-Daten. Es lässt sich feststellen, dass die Transgenität einen stärkeren Einfluss auf das Expressionsmuster der Gene hat als die morphologischen Unterschiede. Ebenso wirkt die Transgenität auf das alternative Spleiß Verhalten der Gene. Die Arraydaten von zwei, sechs und zwölf Monate alten Tieren beruhen auf Mischgewebe, da bei der Aufarbeitung der Gewebe keine Trennung zwischen gesund und „krank“ vorgenommen wurde. Wie anhand des hierarchischen Clusters ersichtlich, ist für zwei und sechs Monate alte Tiere keine eindeutige Unterscheidung möglich, was auf das Mischgewebe zurückzuführen ist. Bei zwölf Monate alten Tieren ist zu beachten, dass diese im transgenen Zustand Tumore entwickeln, im nicht-transgenen Zustand jedoch gesund sind. Aufgrund dessen ist hier eine deutliche Unterscheidung auch bei der Betrachtung des Gesamtdatensatzes möglich. Je jünger die Tiere sind, desto schwieriger wird eine Abtrennung

## **Diskussion**

der Cluster von transgen zu nicht-transgen. Bereits kleinere Erkrankungen der einzelnen Mäuse fallen hier stärker ins Gewicht, da auch diese einen Einfluss auf die Genexpression besitzen. Die histologischen Unterschiede, wie man sie unter dem Mikroskop erkennen kann, und eine separate Aufreinigung dieser morphologischen Unterschiede bieten eine stärkere Sicherheit bei der Interpretation der Arraydaten mit ihren Expressionswerten.

### **5.2 MATCH**

Die TRANSFAC® Datenbank ermöglicht die Analyse auf potentielle Myc-Target Gene, indem der Promotorbereich der Gene nach Myc-Motiven untersucht wird. Die Sequenzlänge des Promotorbereiches der Gene wurde hierzu auf 3000 bp upstream und 100 bp downstream festgelegt. In Studien zu verschiedenen Genen wurde gezeigt, dass der Promotor in der Nähe des Transkriptionsstartes liegt [Schübeler et al., 2004, Pokholok et al., 2005, Guenther et al., 2007, Wierstra und Alves, 2008]. Um eine möglichst hohe Anzahl an potentiellen Myc-Target Genen zu identifizieren, wurde eine spezielle Motiv-Matrix entwickelt, die alle bekannten Myc-Motive inklusive E-box und Max-Motiven mit einschließt. Hierdurch erhöht sich das Ergebnis von falsch positiven Target Genen, die Wahrscheinlichkeit, positive Target Gene zu eliminieren, wird dabei aber gesenkt. Wie anhand der Ergebnisse ersichtlich wird, konnte diese spezielle Motiv-Matrix-Trefferanzahl pro Sequenz von 0,006 auf 0,03 gesteigert werden, was um ein 5-Faches höher ist als mit den einzelnen Motiv-Matrizes. Für die weiteren Untersuchungen mit dem Elektromobility Shift Assay wurden Gene ausgewählt, die sowohl eine signifikant veränderte Genexpression als auch mehrere Matrix-Motive im Promotorbereich besitzen. Von den 20 ausgewählten Genen für die EMSA-Analyse waren 16 Gene als positiv zu bewerten. Es scheint daher sinnvoll zu sein, die Genexpressionsanalyse mit der Promotoranalyse zu ergänzen, um so eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von potentiellen Target Genen zu erhalten.

### **5.3 RT-PCR**

Die MA-Daten konnten mittels der qRT-PCR bestätigt werden. Die in der qRT-PCR ermittelten Expressionswerte korrelieren weitestgehend mit den Werten der MA-Daten. Die größten Unterschiede sind bei den Myc-Target Genen Nme1, Nol5a, Npm1, Rfc4, Rpl13a und Stmn1 festzustellen. Diese Diskrepanz besteht auch bei den weiteren qRT-PCR-Untersuchungen der postulierten Myc-Target Gene. Bei dem Untersuchungsmaterial der qRT-PCR handelt es sich um Lebergewebe aus denselben Tieren, die für die Mikroarray-Analysen benutzt wurden der Unterschied liegt in der Aufarbeitung. So wurde das Material für die MA-

## Diskussion

Daten sowie die MA-Daten durch Katrin Hoffmann aufgearbeitet, das Material für die qRT-PCR aus dem eingefrorenen Restmaterial wurde im Zuge dieser Arbeit verwendet. Als weiteres Ausgangsmaterial wurde gelasertes Lebergewebe mit histologisch unterschiedlichen Befunden eingesetzt, welches aus sechs Monate bzw. sieben Monate alten Tieren gewonnen wurde. Die analysierten Expressionsunterschiede zwischen den MA-Daten und den qRT-PCR-Daten, die bei Myc-Target Genen zu beobachten sind, können möglicherweise von einer unterschiedlichen Myc-Expression herrühren. Des Weiteren ist bei MA-Daten generell zu beachten, dass die Aufarbeitung der Proben mit den zahlreichen chemischen Reaktionen und Nebeneffekten bei der Hybridisierung dazu führt, dass eine Aussage über die absolute Menge der RNA-Transkripte nicht möglich ist, die Ergebnisse können daher lediglich innerhalb eines Experimentes im Verhältnis zueinander betrachtet werden. Diese Expressionsdaten sind folglich die Grundlagen der weiteren Untersuchungen. Schon kleinste Fehler haben einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis der Expressionsdaten und ziehen einen Genauigkeitsverlust nach sich. Die Daten aus der MA-Analyse sollten daher als Tendenz der Expression verstanden werden, die hoch- und herabregulierte Gene erkennt. Neben den Unterschieden in der Aufarbeitung muss bei der Analyse der Gene auch beachtet werden, aus welchem Gewebe sich das Material zusammensetzt. Dies wird auch bei dem Vergleich der Venn-Diagramme ersichtlich. So ist beim Vergleich der Venn-Diagramme von zwei, sechs und zwölf Monate alten Tieren und dem von gesundem, dysplastischem und Tumorgewebe zu erkennen, dass die Anzahl der signifikant regulierten Gene von zwei Monaten zu zwölf Monaten zunimmt. So sind anfangs 72 Gene reguliert, bei zwölf Monate alten Tieren bereits 524. Beim gelaserten Material bleibt die Anzahl der signifikant regulierten Gene (annotierte Gene) bei 103 bis 136 in den unterschiedlichen histologischen Befunden recht konstant. Dies lässt darauf schließen, dass bereits die Transgenität der Tiere einen starken Einfluss auf die Genexpressionen hat. Für das gelaserte Gewebe wurden die verschiedenen histologischen Befunde aus den gleichen Tierproben entnommen, weshalb es nicht verwunderlich ist, dass die Anzahl der signifikant regulierten Gene nicht stark variiert. Bei den zwei, sechs und zwölf Monate alten Tieren handelt es sich um Mischproben. Es ist nicht davon auszugehen, dass in zwei Monate alten Tieren bereits Tumore vorhanden sind. Erste Dysplasien können aber denkbar sein, auch wenn das überwiegende Material aus gesundem Gewebe besteht. In sechs Monate alten Tieren sollte neben Resten von gesundem Gewebe das überwiegende Gewebe aus dysplastischem Gewebe bestehen, dennoch sind bereits einzelne Tumorherde denkbar. Auch bei zwölf Monate alten Tieren ist davon auszugehen, dass das Material nicht ausschließlich aus Tumorgewebe besteht, sondern auch Restbestandteile von gesundem und

## Diskussion

dysplastischem Gewebe enthalten sind. Aufgrund dieser Mischung ist es schwierig, einen direkten Vergleich der verschiedenen Arrays und qRT-PCR-Proben durchzuführen, für die meisten Gene konnte dennoch die Tendenz der Expressionsraten in allen Proben bestätigt werden. Ausnahmen hierfür stellen lediglich die Gene *Skp1a*, *Rps7* und *Tfdp1* dar. Vergleicht man zusätzlich die Werte der MA-Daten mit den Exon Array-Daten, so fallen weitere Unterschiede auf. Das Gen *Skp1a* weist bei dysplastischem Gewebe eine Repression auf und keine signifikante Regulation in den anderen Gewebetypen. Das Gen *Rps7* weist in allen Untersuchungen im Tumorgewebe die höchste Expression auf, ansonsten ergeben sich aber gerade im dysplastischen Gewebe Expressionsunterschiede in den einzelnen Untersuchungen. So wurde im MA bei sechs Monate alten Tieren keine signifikante Regulation festgestellt, in der qRT-PCR aber eine signifikant reprimierte Expression. Dagegen wurde in der qRT-PCR mit gelasertem dysplastischem Material eine signifikant induzierte Expression ermittelt. Das Gen *Tfdp1* weist in keiner Gewebeart eine signifikante Regulation auf, zeigt aber im Gegensatz zu *Skp1a* potentielle alternative Spleiß Varianten auf. Beiden Genen gemeinsam ist, dass sie postulierte und im Rahmen dieser Arbeit bestätigte Myc-Target Gene sind. Die beiden betrachteten Gene scheinen sehr sensitiv auf eine veränderte Myc-Expression zu reagieren, so dass sich bereits kleinste Unterschiede in ihrer Expression bemerkbar machen. Das Gen *Tfdp1* scheint hierzu über den alternativen Spleiß Mechanismus reguliert zu werden. Da bei den Exon Arrays die Nukleotide den gesamten Genbereich abdecken und bei den MA lediglich der 3'-Bereich erfasst wird, können so Unterschiede auftreten. Die Primer, die für die qRT-PCR benutzt wurden, lagen für *Tfdp1* im 5'-Bereich, so dass ein mögliches Spleiß-Event die Diskrepanzen zwischen den ermittelten Genexpressionen erklären würde. Auch die Primer für *Skp1a*, die für die qRT-PCR benutzt wurden, liegen im Bereich des 5'-Endes, so dass die Unterschiede zu den MA-Ergebnissen, die den 3'-Bereich erfassen, ebenfalls über Spleiß Varianten zu erklären wären. Das erste Primer Paar für *Rps7* liegt auf dem zweiten und vierten Exon und deckt somit den mittleren Bereich des Gens ab. Mit diesem Primer Paar wurde allerdings kein PCR-Produkt amplifiziert, wodurch ein zweites Primer Paar zum Einsatz kam, welches sich auf dem dritten und vierten Exon befand. Es besteht folglich die Möglichkeit einer alternativen Transkription.

Die vermutete sensitive Reaktion auf kleinste Unterschiede in der Myc-Expression korreliert mit einer relativ langen Transkriptionsrate [molecules/(cell\*h)] im Vergleich zu Genen, die keine Myc-Target Gene sind (siehe Anhang B). Das Gen *Rfc4*, ebenfalls ein Myc-Target Gen, hat eine relativ kurze Transkriptionsrate, wodurch eine schnellere Anpassung auf Expressionsunterschiede möglich ist. Dies erklärt die gute Korrelation der MA- und qRT-

## Diskussion

PCR-Daten. Das Gen Bzw2 besitzt im Gegensatz dazu eine relativ lange Transkriptionsrate. Da es sich bei Bzw2 aber um kein Myc-Target Gen handelt, reagiert es auf Expressionsunterschiede von c-Myc nicht, so dass auch hier die MA- und qRT-PCR-Daten der verschiedenen Untersuchungen gut korrelieren. Die Ergebnisse der Transkriptionsraten, die für die Tabelle im Anhang B benutzt wurden, stammen aus der genomweiten Analyse von MCF7-Zellen [Schwanhäuser, B. et al., 2011]. Diese Analyse konnte auch zeigen, dass mRNA-Gehalte 40 % der Variabilität der Proteingehalte erklären. Ferner scheint die Proteininstabilität im Vergleich zur Kontrolle der Translation eine geringere Rolle im untersuchten System zu spielen. Man muss allerdings beachten, dass die Halbwertszeiten von Proteinen sehr unterschiedlich sein können, so kann sich die Halbwertszeit eines Proteins sogar in Abhängigkeit von Zelltyp, Zellzyklusphase, Wachstumsbedingungen und äußeren Signalen unterscheiden [Pollard und Ernshaw, 2008].

### 5.4 Myc und die Zellzyklusregulation

c-Myc spielt eine essentielle Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige c-Myc-Target Gene identifiziert werden, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind und in dysplastischem Gewebe der Leber und im hepatozellulären Karzinom vorkommen. Die Identifikation dieser genetischen Veränderungen ermöglicht eine genauere Unterscheidung und Analyse von dysplastischen Zellen bis hin zur malignen Transformation. Aus der Literatur sind bereits zahlreiche Informationen über die Rolle von c-Myc in der Kontrolle des Zellzyklus, des Metabolismus und der Ribosomenbiogenese vorhanden. Wenig erforscht sind allerdings die genetischen Veränderungen, die mit der Dysplasie, die weiter zu einem hepatozellulären Karzinom prozessieren kann, assoziiert sind [Eisenmann, 2001; Partel et al., 2004].

Das im Labor des Fraunhofer Instituts verwendete transgene Mausmodell für HCC ermöglicht die Analyse verschiedener Stadien des HCC. Die Leberzell dysplasie wurde definiert als nukleare Atypie mit „*large cell changes*“ (LCC) und „*foci of altered hepatocytes*“ (FAH), die sich an der Grenze zur malignen Transformation befinden. Der pathogene Zusammenhang zwischen Leberzell dysplasie und hepatozellulärem Karzinom ist noch nicht im Detail verstanden. Wie bei vielen anderen Krebsarten auch, ist die fortschreitende Entwicklung des HCC durch genetische Veränderungen charakterisiert. Die vorliegende Arbeit beschreibt ein c-myc-transgenes Mausmodell für die Hepatokarzinogenese, die die verschiedenen Phasen des Leberkrebses widerspiegelt. Die ersten morphologischen Veränderungen, die beobachtet werden konnten, wurden nach vier bis fünf Monaten als LCCs identifiziert. LCCs, wie auch

## Diskussion

FAHs, sind Kennzeichen der hepatozellulären Dysplasie [Drebber und Dienes, 2006; Schirmacher et al., 2001]. Ihre Differenzialdiagnose umfasst im Wesentlichen neben dem hochdifferenzierten hepatozellulären Karzinom (HCC) und seiner prämaligen Vorläuferläsion, dem dysplastischen Knoten (DN), den multiazinären Regeneratknoten, das hepatozelluläre Adenom/Leberzelladenom (LCA) und die fokale noduläre Hyperplasie (FNH) [Schirmacher et al., 2001]. Bei den morphologischen Veränderungen handelt es sich um eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, die zwischen derjenigen des hepatozellulären Karzinoms und der der gesunden Leberzelle einzuordnen ist [Neuhaus und Wittekind, 2007].

Diese morphologischen Veränderungen sind Entwicklungsstadien unmittelbar vor der Initiation zur malignen Transformation. Durch eine Expressionsanalyse des Genoms mittels Microarray konnten unterschiedlich exprimierte Gene zu den verschiedenen Entwicklungsstadien der Krankheit identifiziert werden. Zur ersten Interpretation der Mikroarray-Daten wurde eine hierarchische Cluster-Analyse herangezogen. Der Vergleich von zwei, sechs und zwölf Monate alten Tieren, die histopathologisch transgenem, dysplastischem und kanzerogenem Lebergewebe entsprechen, zeigt distinkte Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Die genomweite Expressionsanalyse identifizierte unterschiedlich exprimierte Gene, die diesen Stadien zugeordnet werden konnten. Dies unterstreicht die histopathologischen Befunde und bestätigt die Dysplasie als präkanzerogenes Entwicklungsstadium.

Der Vergleich der drei Cluster zeigt relevante Unterschiede in der Expression. Für das Lebergewebe aus zwei Monate alten Tieren werden im Vergleich zu morphologisch dysplastischem Gewebe von sechs Monate alten Tieren nur moderate Expressionsunterschiede und weniger signifikante Gene beobachtet. Die signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen diesen beiden Gruppen zeigen die zugrundeliegenden Faktoren, die einer malignen Transformation originär sind. In zwölf Monate alten Tieren ist ein HCC bereits vollständig entwickelt, was sich auch deutlich im Expressionsmuster dieser Tiere zeigt. Die sukzessiven Stadien des Leberkrebses lassen sich anhand der histologischen und der Genexpressionsanalysen darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Entwicklungsstadien der Transgenität, der Dysplasie und eines mittelschweren HCCs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im c-Myc überexprimierenden Mausmodell mit zunehmendem Krankheitsbild eine Vielzahl der signifikant regulierten Gene den Zellzyklus betreffen. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde ebenfalls gezeigt, dass in vielen Krebsarten eine Überexpression von c-Myc den Zellzyklus direkt beeinflusst oder Gene dereguliert, die diesen beeinflussen [Dang et al.,

## Diskussion

1999; Dang et al., 2006; Wu et al., 2008].

Bei der Analyse der Microarray-Daten konnten in den sechs Monate alten Tieren mit nachweislichen Dysplasien 36 % der signifikant regulierten Gene als bereits bekannte Markergene für Krebs identifiziert werden. Ferner sind 24 % der Gene direkt oder indirekt mit der Regulation des Zellzyklus involviert. Von diesen ist von 18 Genen bereits bekannt, dass sie eine veränderte Regulation im Krebs aufweisen.

Es konnte eine gegensätzliche Regulation von Gas5 in zwei und sechs Monate alten Tieren beobachtet werden. Gas5 (*Growth arrest-specific 5*) ist eine nicht-kodierende RNA, welche von Smith & Steitz [1998] als „multi-small-nucleolar-RNA“ (snoRNA) klassifiziert wurde. Diese nicht-kodierende RNA ist abwesend in Zellen, die sich im Zellzyklusarrest befinden [Kino T. et al., 2010]. Dieser Zellzyklusarrest wurde durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen induziert und sensibilisiert die Zellen für eine Apoptose durch die Repression der Glucocorticoid-vermittelten Induktion. Hierbei bindet Gas5 an die DNA-bindende Domäne des c-Rezeptors (GR) und agiert dort wie ein Glucocorticoid Response Element (GRE), mit dem es um die Bindungsstelle konkurriert [Kino T. et al., 2010].

Die Hypothese einer weiteren Studie schlägt vor, dass Zytokine den Ausstieg aus dem Zellzyklus forcieren, wobei eine Herabregulation von ID-1 mit einer Hochregulation des Gas5-Transkriptes einhergeht [Rozenal et al., 2000]. Ebenso wird eine erhöhte Expression des Gas5-Transkriptes während der frühen und späten Phase des Wachstumsarrestes beobachtet [Gokhan et al., 1998]. Es ist bereits bekannt, dass c-Myc andere Gene der *Gas* Familie herabreguliert. Eines dieser Gene ist beispielsweise *Gas1* [Lee et al., 1997]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Repression des *Gas5*-Gens, reguliert durch c-Myc, die Zellzyklusprogression fördert, was auch durch die Vergleichsanalyse der zwei und sechs Monate alten Tiere ersichtlich wird. Des Weiteren konnte eine DNA-Bindung von c-Myc mit Gas6, einem weiteren Familienmitglied dieser Genfamilie, bestätigt werden.

Das Gen *Gnb2l1* war ebenso in zwei Monate alten Tieren signifikant reguliert. Das Adapterprotein Rack1, welches durch *Gnb2l1* kodiert wird, induziert einen partiellen G1-Phase-Arrest durch die hemmende Wirkung auf die Src-Kinase-Aktivität. Als Konsequenz davon werden CyclinD1 und die Cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 4 reprimiert, während der CDK-Inhibitor p27 und das Retinoblastoma-Protein aktiviert werden. Durch die Absonderung von E2F1 wird die G1/S-Progression verhindert [Mamidipudi et al., 2004]. Möglicherweise führt die erhöhte Expression von *Gnb2l1* in zwei Monate alten Tieren über die zuvor genannten Mechanismen zu einer verringerten Proliferation in den c-Myc-transgenen Tieren.

## Diskussion

In sechs Monate alten Tieren konnte keine signifikante Expression von Gnb211 analysiert werden, so dass hier der G1-Phase-Arrest verhindert wird und es möglicherweise zu einer erhöhten Proliferation kommt.

Ein weiteres Gen, das in den zwei Monate alten Tieren signifikant reguliert war, ist Fabp7, welches ein immunogenes Melanoma-Antigen ist und in vielen Krebsarten überexprimiert vorliegt. Es ist bekannt, dass Fabp7 die Zellproliferation fördert und die Invasion der extrazellulären Matrix beeinflusst [Goto et al., 2006]. Es wird vermutet, dass die Funktion von Fabp7 durch einen erhöhten Lipidmetabolismus über den Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptor gamma (PPAR $\gamma$ ) erzielt wird. Ferner sind Fabp7 und die Wechselwirkung mit PPAR $\gamma$  von bedeutendem Interesse, da PPAR $\gamma$ -Antagonisten bereits klinisch evaluiert wurden und einen therapeutischen Nutzen bei hepatozellulärem Karzinom besitzen [Kim et al., 2007]. Die Daten zeigen eine erhöhte Expression in zwei Monate alten Tieren, aber keine signifikante Expression in sechs Monate alten Tieren. Gnb211 und Fabp7 scheinen relativ schnell auf eine veränderte c-Myc-Expression zu reagieren. Während Gnb211 versucht, die Proliferation zu verringern, fördert sie Fabp7, diese Gene agieren also gegenläufig. Da in zwei Monate alten Tieren noch kein Krankheitsbild auftritt, zeigt diese gegensätzliche Regulation der Proliferation eine durch die Transgenität beeinflusste Genregulation.

Des Weiteren ist BolA2 in zwei Monate alten transgenen Tieren überexprimiert. Die eukaryotische Unterfamilie von BolA-ähnlichen Proteinen ist weitgehend konserviert in Prokaryoten bis Eukaryoten und involviert in der Zellproliferation und der Zellzyklusregulation [Kim et al., 2002; Kim et al., 1997; Lee et al., 1994]. Im BolA-Homolog von *Schizosaccharomyces pombe* (uvi331) ist die Expression des Gens zellzyklus- und wachstumsphasenabhängig [Kim et al., 1997; Lee et al., 1994], die Deletionsmutante uvi31 proliferiert z. B. schneller als das Wildtypgen. Des Weiteren wurde eine abnormale Trennung nach einem UV-induzierten Zellzyklusarrest beobachtet [Kim et al., 2002]. Durch einen EMS-Assay im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Bindung des Myc-Proteins an die regulatorische Sequenz von BolA2 beobachtet werden, ebenso eine erhöhte Expression in HGF-stimulierten humanen Hepatoma-Zellen (HepG2). Myc kann folglich über die Regulation von BolA2 in die Zellzyklusregulation eingreifen.

Das ribosomale Protein S7 (Rps7) wurde ebenfalls als Myc-Target Gen identifiziert. Dieses zeigte eine Bindung mit Mdm2 [Chen et al., 2007], hierdurch wurde eine Modifikation des Mdm2-p53-Komplexes veranlasst, welches die enzymatische Aktivität verändert. Es kommt zu einem Komplex aus Mdm2, p53 und Rps7, welcher das Protein p53 stabilisiert, weil die Mdm2-vermittelte Ubiquitinierung von p53 aufgehoben wird. Die Konsequenz daraus ist,

## Diskussion

dass eine Überexpression von Rps7 die p53-Aktivität erhöht, wodurch es zur verstärkten Apoptose und verringerter Zellproliferation kommt [Chen et al., 2007].

Das S-Phase-Kinase-assoziierte Protein 1A (Skp1a), ein Mitglied der F-Box-Familie, kodiert Proteine für den SCF-Komplex. Viele Proteine dieser Familie wurden als Proteine identifiziert, die das Fortschreiten des Zellzyklus und die Entwicklung regulieren. Eine verminderte Expression der humanen SKP1a-mRNA wurde in fortgeschrittenem papillärem Eierstockkrebs beobachtet [Donninger et al., 2004]. SKP1 ist ein wichtiger Partner in verschiedenen Zellzyklusereignissen mit verschiedenen *skp1*-Mutanten, die zu einem G1-Phase- und G2-Phasearrest führen und Chromosomeninstabilitäten aufweisen. Zellen ohne SKP1A wurden beschrieben als Zellen, die keinen G0/G1-Phasearrest besitzen [Fishman-Jacob et al., 2009]. Die Regulation von Skp1a ist folglich entscheidend für einen fortschreitenden Zellzyklus.

Basierend auf den Microarray-Ergebnissen können diverse Gene als neue c-Myc-Target Gene vorgeschlagen werden. Hierbei wurde zunächst auf zellzyklusregulierende Gene fokussiert und deren c-Myc-Bindung im Kontext der Dysplasie analysiert.

Die CCATT/Enhancer-bindenden Proteine  $\alpha$  und  $\beta$  sind in sechs Monate alten Tieren herabreguliert. Cebp $\alpha$  bindet als Homodimer an regulatorische Sequenzen, bildet aber auch Heterodimere mit Cebp $\beta$  aus. Seine Funktion ist die Inhibition der mitotischen Signalisierung. Dieses in der Leber erhöht vorkommende Protein zeigte ferner eine Interaktion mit zellzyklusregulierenden Proteinen und überdies eine veränderte Aktivität dieser Proteine.

Neben diesem konnte für das Protein Cebp $\beta$  eine direkte Repression von muriner c-Myc-mRNS gezeigt werden [Sebastian et al., 2005]. Der Protein-Protein-Komplex aus Cebp $\alpha$  und E2f4 verringert die Expression des c-Myc-Transkriptes ebenfalls [Johansen et al., 2001]. Verschiedene regulatorische Schleifen wurden identifiziert, bei denen Cebp $\alpha$  den Zellzyklusarrest über die p21 Cyclin-abhängige Kinase und den E2f-Komplex vermittelt, während c-Myc die Transkription des Cebp $\alpha$ -Genes herabreguliert [Iakova et al., 2003]. Diese Ergebnisse bestätigen die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse in sechs Monate alten Tieren, die eine erhöhte c-Myc-Expression und eine verringerte Cebp $\alpha$ -Expression aufweisen.

Das Gen Lgals zeigt eine erhöhte Expression. Lgals ist ein Galektin, das zur Familie der beta-Galaktosidase-bindenden Proteine gehört. Diese spielen eine Rolle in der Modulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Es wird ferner vermutet, dass das Gen LGALS1 als ein Autokrin und negativer Wachstumsfaktor die Zellproliferation reguliert [Barondes et al., 1994]. Diese negative Regulation des Zellzyklus zeigt, dass die Dysplasie noch Mechanismen

## Diskussion

zur Kontrolle des Zellzyklus einsetzt und somit noch keine unwiderrufliche „Einbahnstraße“ in Richtung Krebs darstellt. Durch die erzielten Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit ist ferner zu vermuten, dass die Progression des Zellzyklus durch die erhöhte Expression in zwei und sechs Monate alten Mäusen ebenfalls von Jsd3 reguliert wird. Diese Vermutung stützen die Ergebnisse aus der humanen Krebsforschung, wo ebenfalls eine erhöhte Expression von JOSD3 beobachtet wurde. Des Weiteren führt ein siRNS-Knockdown von Jsd3 zur Apoptose und zum Zellzyklusarrest von Tumorzellen in der S-Phase [Wang et al., 2004]. Ein weiteres in dieser Arbeit näher analysiertes Gen ist Mybbp1a (Myb-binding protein 1a), dessen mRNS-Expression durch Myc reguliert wird [O'Connell et al., 2003]. Ursprünglich wurde Mybbp1a als ein c-Myb-Onkogen identifiziert. Mybbp1a interagiert mit c-Myb und bindet an verschiedene andere Transkriptionsfaktoren. Die Inhibition der ribosomalen Biogenese induziert die Prozessierung von p160(MBP) zu p140(MBP) und p67(MBP). Dieses bedingt eine Translokation des Mybbp1a-Proteins aus dem Kern ins Nukleoplasma.

Daraus folgt, dass Mybbp1a an der Biogenese der Ribosomen und an der Myb-abhängigen Transkription, die die Zellzyklusprogression und Proliferation kontrolliert [Yamauchi et al., 2008], beteiligt sein könnte. Die Vermutung wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert, da gezeigt werden konnte, dass Mybbp1a ein Myc-Target Gen ist. Neben Mybbp1a sind auch verschiedene Gene, die an der Biogenese der Ribosomen beteiligt sind, als Myc-Target Gene identifiziert worden, wodurch die Vermutung naheliegt, dass Mybbp1a an der Biogenese der Ribosomen sowie der Zellzyklusprogression und Proliferationskontrolle beteiligt ist.

Es wurde gezeigt, dass eine unzureichende RPS19-Proteinproduktion den Zellzyklusarrest in erythroiden Vorläuferzellen induziert [Kuramitsu et al., 2008]. Auch führt ein mutiertes Rps19-Protein zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase [Badhai et al., 2009]. Es konnte ferner eine erhöhte Expression der mRNS von Rps19 in c-Myc-Knockouts beobachtet werden [Guo et al., 2000]. Im EMSA zeigte sich ein Supershift und es wurde eine erhöhte Expression in HGF-behandelten HepG2-Zellen beobachtet. Die Kombination dieser Ergebnisse zeigt, dass Rps19 als ein Myc-Target Gen in Betracht kommt. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass eine Deregulation von Rps19 eine Dysplasie fördert, da es direkt auf den Zellzyklus einwirkt und die erhöhte Expression von Rps19 in zwei und sechs Monate alten Tieren einen Zellzyklusarrest verhindert.

Ein weiteres c-Myc-Zielgen wurde mit Rpl10a in der Dysplasie gefunden. Die Bindung des p19 Arf-Proteins mit dem Rpl10a-Protein zeigt einen induzierten Wachstumsarrest in NIH/3T3-Zellen [Bertwistle et al., 2004]. Mit dem Tumorsuppressor Arf wird ein p53-

## Diskussion

abhängiger Zellzyklusarrest induziert, wodurch auch Rpl10a für die Zellzyklusregulation von Bedeutung wird.

Der Transkriptionsfaktor Dp1 (Tfdp1) wurde ebenfalls mittels EMSA untersucht. Er reguliert eine Reihe von biologischen Prozessen, z. B. den G1/S-Phase-Übergang [Chan et al., 2002; Chen et al., 2002]. In Verbindung mit dem Dimerisationspartner Tfdp1 binden E2F-Faktoren als Homo- oder Heterodimere an die DNA. In Hela-Zellen bindet E2F6 an Max, Mga und an das Tfdp1-Protein [Ogawa et al., 2002]. Die Bindung eines methylierten DNA-Fragmentes, welches eine E2F-Bindestelle und einen Protein-Protein-Komplex aus E2F und TFDP1 besitzt, konnte in der nuklearen Fraktion von X50-7-Zellen identifiziert werden [Campanero et al., 2000]. Die Identifikation von Tfdp1 als ein potentiell c-Myc-Zielgen lässt eine Rückkopplungsschleife zwischen allen drei zuvor genannten Transkriptionsfaktoren vermuten.

Zusammenfassend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mehrere neue c-Myc-Zielgene gefunden, im Speziellen Zellzyklusgene, die in dysplastischen Zellen und später auch im HCC reguliert sind und somit die fortschreitende Tumorigenese dokumentieren. Des Weiteren konnten die damit einhergehenden Veränderungen der Genexpression, die entscheidend in der Tumorentwicklung sind, in einen Zusammenhang mit diesen neu identifizierten Zielgenen gebracht werden. Von entscheidender Bedeutung hierfür ist, dass die Genexpression in rein dysplastischem und in reinem Tumorgewebe, welches mittels Lasermikrodissektion gewonnen wurde, mit den Ergebnissen aus sechs und zwölf Monate alten Tieren übereinstimmt. Daher ist das transgene Tiermodell mit einer c-Myc-Überexpression als ein geeignetes Modell für die Identifikation von Genen, die den molekularen Schalter sequenziell zur Malignität umlegen, anzusehen. Das Modell führt von gesunden Hepatozyten zur Dysplasie und von dort in die maligne Transformation. Die neu identifizierten c-Myc-Zielgene wurden ferner in einer Reporterstudie bestätigt, die in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 unter Einwirkung von HGF durchgeführt wurde. Die Genexpression der Microarrays wurde mittels qRT-PCR verifiziert und die potentiellen c-Myc-Zielgene im EMSA bestätigt. Daher sind folgende Gene als c-Myc-Zielgene anzusehen, die in der Großzelldysplasie von Hepatozyten und in der Zellzyklusregulation auftreten: Mybbp1a, Rps7, Rps19, Rpl10a, Skp1a, Tfdp1, Nhp2 und BolA2. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass eine Dysplasie nicht immer zu einem Karzinom fortschreitet. Es festigt sich jedoch der Anschein, dass diese maligne Transformation, abhängig vom Grad der Dysplasie, beispielsweise von niedrig- und hochgradiger Dysplasie (LCD und FHS), zu einem Karzinom

## Diskussion

fortschreiten kann, wenn die Expression von c-Myc, wie in diesem Modell, nicht vermindert wird.

### 5.5 Die Bedeutung von Myc in der Karzinogenese

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell verursacht ein hepatozelluläres Karzinom durch die Überexpression des Onkogens c-Myc. Insbesondere die Deregulation von c-Myc ist mit den Netzwerken des Arylhydrocarbon-Rezeptor-Signalweges, der Zellzyklusregulation mit der G1/S-Phase-Regulation, dem Endothelin-1-, ERK/MAPK-, Neuregulin-, p38 MAPK-, PDGF-, Thrombopoitin- und Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweges assoziiert [Liu und Levens, 2006; Kolligs et al., 2002]. Viele der in sechs und zwölf Monate alten Tieren regulierten Gene sind auch in einem oder mehreren dieser zuvor genannten Netzwerke zu finden. Da eine c-Myc-Inaktivierung eine Tumorigenese reversibel zu machen scheint [Shachaf und Felsher, 2005 (A) und (B); Karlsson et al., 2003], sind die durch c-Myc aktivierten Netzwerke von großem Interesse für therapeutische Angriffsziele. Da das gewählte Mausmodell eine genetische Studie der sequenziellen Stadien des Leberkrebses ermöglicht, gestattet dieses ebenfalls die Identifikation von Genen in regulatorischen Netzwerken mit Transformationseffizienz. Um falsch positive Ergebnisse in der Zielgenanalyse zu minimieren, wurden die Analysen bei bereits bekannten Krebsgenen durchgeführt, die in den Microarray-Daten von zwölf Monate alten Tieren mit HCC reguliert waren. Ferner ermöglicht diese Einschränkung einen detaillierten Blick auf c-Myc-Zielgene, die mit Krebs assoziiert sind. Die exklusiv regulierten Gene in sechs Monate alten Tieren mit Dysplasie liefern außerdem einen detaillierten Blick auf regulatorische Veränderungen in der Tumortransformation.

Bei der Fokussierung auf sechs Monate alte Tiere mit Leberzell dysplasie scheint es, dass die ersten Deregulierungen durch eine Umgestaltung des Zytoskeletts, der Zelladhäsion und der Zellmobilität und damit assoziierten Genen zu finden sind. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine signifikante Regulation der folgenden Signalwege: Akutphasenreaktion (APR), LPS/IL-1-vermittelte Inhibition der RXR-Funktion, FXR/RXR-Aktivierung, PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ -Aktivierung und der IL-10-Signalweg.

Die Umgestaltung des Zytoskeletts wird durch die reduzierte Expression von Genen wie Arhgef1, Actn1 und Igfbp4 in Tieren mit Dysplasie und der induzierten Expression von Stmn1 in Tieren mit HCC erzielt. Stmn1 ist ein wichtiges Gen für den RhoA-Signalweg, die Zelladhäsion und die Integrin-vermittelte Zellmigration. Darüber hinaus wird das Gen Vill1 in

## Diskussion

Tieren mit HCC erhöht exprimiert. Dieses Gen kodiert ein Mitglied der Familie von Kalzium-regulierten Aktin-bindenden Proteinen, welche einen großen Teil des Zytoskeletts der Bürsteneithelien (Enterozyten) ausmachen und dort die Funktion des Capping, Abtrennen und Bündeln der Aktinfilamente übernehmen. Villin wird demnach zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der kanalikulären Mikrovilli benötigt, die membranständige Transporter für die Gallensekretion beinhalten [Phillips et al., 2003]. Villin wurde ferner als strukturelles Protein beschrieben, das imstande ist, die Dynamik des Aktinfilamentsystems abhängig vom HGF-aktivierten PLC $\gamma$ -Signalweg [Athman et al., 2002; Athman et al., 2003; Wang et al., 2007] zu beeinflussen. Des Weiteren wurde Villin als diagnostischer Marker für das Zervix-Adenokarzinom identifiziert [Nakamura et al., 2009]. Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren Villin auch als ein Zielgen von c-Myc, welches die Annahme festigt, dass die Deregulation von c-Myc und die Umgestaltung des Zytoskeletts entscheidend bei der frühen malignen Transformation sind.

Die Akutphase-Proteinantwort ist assoziiert mit einer großen Anzahl von Patienten, die verschiedene Krebsarten aufweisen [Falconer et al., 1994; Staal-van den Brekel et al., 1995; Wayman et al., 1997]. Dies ist der Fall, da die Akutphase-Antwortreaktion eine schnelle Entzündungsreaktion ist, die Schutz gegen Mikroorganismen bietet, indem unspezifische Abwehrmechanismen benutzt werden. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass eine erhöhte Anzahl an regulierten Genen in Krebsgewebe zu finden ist, die diesem Signalweg angehören.

Es wurde eine Vielzahl von Genen gefunden, die in Verbindung mit Entzündungsreaktionen (*Inflammatory Factors*) stehen. Zu diesen gehört das neu identifizierte c-Myc-Zielgen C9, welches ein pro-inflammatorisches Zytokin ist und reprimiert vorliegt. C9 ist bekannt dafür, die Proliferation sowie die Migration und Angiogenese zu inhibieren [Ren et al., 2009]. Eine erhöhte C9-Expression ist ebenfalls mit einem herabregulierten RAF-MEK-ERK-Signalweg assoziiert [Ren et al., 2009]. Da der RAF-MEK-ERK-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Krebstherapie spielt [Hilger et al., 2002], eröffnet das Zusammenspiel von C9, c-MYC und der Regulation des RAF-MEK-ERK-Signalweges neue Möglichkeiten in der Krebstherapie. Andere Gene wie *Dusp1*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Ikbkg*, *Il1r1*, *Jun*, *Max*, *Nlk*, *Pdgfra*, *Pla2g6*, *Rac2*, *Rasgrp2*, *Stmn1* und *Trp53* sind signifikant reguliert und stehen ebenfalls mit dem RAF-MEK-ERK (MAPK)-Signalweg in Verbindung (<http://www.genome.jp/kegg/>). Das Gen *Pdgfra* wurde auch als neues c-Myc-Zielgen identifiziert. Dies stützt die Vermutung, dass der RAF-MEK-ERK-Signalweg bei der Leberkrebsentstehung von entscheidender Bedeutung ist und die Deregulation von c-Myc eine Schlüsselrolle spielt. Darüber hinaus ist *Pdgfra* auch

## Diskussion

maßgeblich eingebunden in die Aktin-Zytoskelett-Signalwege, die axonale Signalwege, die Clathrin-abhängige Endozytose, die Ephrin-Rezeptor-Signalkaskaden, Leberfibrose und Sternzellaktivierung, Makropinozytose, PDGF-Signalkaskaden, PPAR-Signalkaskaden und die VDR/RXR-Aktivierung [Ding et al., 2004].

*GAS6* wurde in verschiedenen Veröffentlichungen als ein Gen beschrieben, welches das Protein GAS6 kodiert, das wiederum in der Kontrollfunktion des Immunsystems als anti-inflammatorischer Faktor wirken kann [Lu und Lemke, 2001; Alciato et al., 2010]. Die Repression des *Gas6*-Gens im c-Myc-überexprimierenden Mausmodell und die Identifizierung als c-Myc-Zielgen zeigen, dass c-Myc ein Repressor von anti-inflammatorischen Proteinen ist. Ferner ist bekannt, dass Gas6 die Gene *Akt*, *Mapk1*, *Erk*, *NFκB*, *Rac* und *Stat3* [Vajkoczy et al., 2006] reguliert, jedoch Gas6 durch Jun reguliert wird. Zusammengefasst zeigen die regulierten Gene und die neu identifizierten c-Myc-Zielgene, dass Gas6 möglicherweise mit dem Akutphase-Antwort-Signalweg assoziiert ist, was bereits von Fernandez-Fernandez et al. [2008] postuliert wurde.

Die Endotoxin-Lipopolysaccharide (LPS) sind wichtige Komponenten der äußeren Membran von grampositiven Bakterien und induzieren die Immunantwort des Wirtes durch die Bindung an SD14/TRL4/MD2-Rezeptor-Komplexe, welche die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF $\alpha$  fördern. Ferner reguliert LPS die Expression leberspezifischer Gene der negativen Akutphase-Antwort (APR) der Leber herab [Takeyoshi et al., 2005; Zhong et al., 2006].

Der Retinoid X-Rezeptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation multipler Leberfunktionen und reguliert ebenfalls Gene der negativen Akutphase-Antwort (APR) der Leber. Diese Gruppe beinhaltet den Leber X-Rezeptor (LXR), den Farnesoid X-Rezeptor (FXR), den Retinoidsäure-Rezeptor (RAR), konstitutiv den Androgen-Rezeptor (CAR), den Pregnane X-Rezeptor (PXR) und den Peroxisomen-proliferationaktivierenden Rezeptor (PPAR). In Abhängigkeit von den pro-inflammatorischen Zytokin-Signalwegen unterzieht sich RXR $\alpha$  einem JNK-abhängigen CRM-1-abhängigen Kernexport, welcher zu einer Verringerung der RXR $\alpha$ -Konzentration im Kern und einer reduzierten DNA-Bindung und transkriptioneller Aktivität führt. Die Reduktion der Expression der Transportproteine der Leber wie ABC, OATP, MDR1, NTCP und abhängigen Enzyme wie CYP, GST, UGT, SOD sowie dem metabolisierenden Enzym CYP7A1 führt zu einem verschlechterten Metabolismus, Transport und/oder Biosynthese von Lipidproteinen, Cholesterol, Gallensäure und Xenobiotika [Stanca et al., 2001; Faber et al., 2003].

## Diskussion

Slc10a1 ist ein Natrium-Gallensäure-Kotransporter, welcher als Glycoprotein in die basolaterale Membran von Hepatozyten integriert und in den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäure eingreift. Der Fluss der Galle wird bei der Leberentzündung extrem reduziert. Ferner wird eine reduzierte Expression der Importer- und Kotransporter-Polypeptide der Leber wie Slc10a1 festgestellt [Zollner et al., 2001]. Es wurde ferner gezeigt, dass IL1 $\beta$ , ein physiologischer Mediator der Leberentzündung, mit der JNK-abhängigen Unterdrückung der nuklearen RXR:RAR-Bindeaktivität verbunden ist, die zur verringerten Slc10a1-Expression führt [Li et al., 2002]. Es ist bekannt, dass Slc10a1 in den Signalwegen der FXR/RXR-Aktivierung, Leber-Cholesterasis und der LPS/IL-1-abhängigen Inhibierung der RXR-Funktion eine Rolle spielt [Li et al., 2002].

Im Jahr 2000 wurde eine Reihe von möglichen DNA-Bindestellen für die in der Leber angereicherten Binfaktoren HNF3, HNF6 und CEBPA sowie für eine große Anzahl an ubiquitären Transkriptionsfaktoren [Shiao et al., 2000] identifiziert. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen für Cebp $\alpha$  auf der Gen- und Proteinebene eine verringerte Expression.

Der Promotor zeigt ebenfalls eine mögliche Bindestelle für das Protein STAT1. Die Kotransfektion von CEBPA erhöht ferner die Aktivität des SLC10A1-Promotors. Die EMSA-Ergebnisse dokumentieren zusätzlich die spezifische Protein-DNA-Interaktion zwischen CEBPA und CEBPB. CEBPA wurde bereits als c-Myc-Zielgen identifiziert [Fernandez et al., 2003], die EMSA-Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren auch die spezifische Protein-DNA-Bindung zwischen Slc10a1 und c-Myc. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren auf vielfältige Weise reguliert werden.

Tmem97 ist ein Transmembranprotein, dessen mRNS fötal, aber nicht adult in der Leber exprimiert wird. Tmem97 besitzt zudem einen Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der Leber [Moparthi et al., 2007]. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass Tmem97 eine abnormale Expression in Krebsgeweben aufweist [Wilcox et al., 2007; Zhang et al., 2006; Kaye et al., 2004] und durch c-jun, p53, BRCA1, RB1, CDKN2a und Dexamethasone reguliert wird. Diese Regulation weist auf die Rolle von Tmem97 in den verschiedenen Signalwegen von Entzündungen hin. Die Identifikation von Tmem97 als neues c-Myc-Zielgen untermauert dieses und bestätigt ferner den vermuteten Einfluss auf die Leberdifferenzierung und das Wachstum.

Das Protein, welches durch das Gen Ramp2 (G-Rezeptor-gekoppeltes Proteinaktivitätsmodifizierendes Protein 2) kodiert wird, ist ein Mitglied der RAMP-Familie der Signal-Transmembrandomäne-Proteine, das auch Rezeptor (calcitonin)-

## Diskussion

aktivitätsmodifizierendes Protein (RAMPs) genannt wird. RAMPs sind Typ 1-Transmembranproteine mit einem extrazellulären N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus. RAMPs werden für den Transport von Calcitonin-rezeptorähnlichen Rezeptoren (CRLR) zur Plasmamembran benötigt. CRLR, ein Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, kann als Calcitonin-genabhängiges Peptid (CGRP)-Rezeptor sowie als ein Adrenomedullin-Rezeptor fungieren, abhängig davon, welche Mitglieder der RAMP-Familie exprimiert werden. In Gegenwart des Proteins RAMP2 fungiert CRLR als ein Adrenomedullin-Rezeptor. Das Protein RAMP2 ist dadurch in die Kern-Glykosylierung und den Transport der Adrenomedullin-Rezeptoren zur Zelloberfläche eingebunden.

Wie zuvor erwähnt, ist eine der wichtigsten Veränderungen zwischen den Tieren mit Dysplasie und den Tieren mit Leberkrebs in den Signalwegen der RXR-Funktion und -Aktivierung und der Akutphase-Antwort mit der Regulation der Interleukine zu finden. So zeigte sich, dass nur ein Interleukin, das *Il13ra1*, in sechs Monate alten Tieren herunterreguliert vorgefunden wurde. Dieses Gen ist auch in zwölf Monate alten Tieren reprimiert, neben diesem Interleukin finden sich noch weitere regulierte Interleukine in den zwölf Monate alten Tieren. Insbesondere das Gen *Il1R1* (Interleukin 1-Rezeptor) zeigte eine signifikant erhöhte Expression. Dieser Rezeptor reguliert den Signalweg der Akutphase-Antwort, den Il-10- und IL-6-Signalweg sowie die LPS/IL-1-abhängige Inhibition der RXR-Funktion, der LXR/RXR-Aktivierung, den NF- $\kappa$ B-Signalweg, den p38-MAPK-Signalweg, den PPAR-Signalweg und die PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ -Aktivierung.

Wie durch Abbildung 4.3.6 C3 (Signalweg: Lipidmetabolismus und Biochemie kleiner Moleküle) ersichtlich wird, ist eine große Anzahl an Zytochromenzymen reguliert. Hierbei ist die größte Anzahl der Zytochrome in ihrer Expression vermindert, mit Ausnahme des Zytochrom CYB5B, welches in zwölf Monate alten transgenen Tieren mit Leberkrebs verstärkt exprimiert wird. Dieses Zytochrom, welches in diesem Signalweg verstärkt exprimiert wird, reguliert das Zytochrom CYP17A, das einen essentiellen regulatorischen Schritt im Glucocorticoid-Signalweg katalysiert [Billen und Squires, 2009]. Es wurde bereits berichtet, dass die enzymatische Aktivität von CYP3A4 in Leberzirrhosen verringert ist [Horiike et al., 2005]. In den c-Myc-transgenen Tieren mit HCC konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls eine verringerte Expression beobachtet werden.

In sechs Monate alten transgenen Tieren sind die Gene/Proteine RNA Polymerase II, PECK, CEBPA und CEBPB des Glucocorticoid-Signalweges reprimiert. Diese lokalisieren ausschließlich im Kern. In den zwölf Monate alten transgenen Tieren sind im Glucocorticoid-Signalweg die Gene/Proteine IKK, Osteocalcin, TFIIB, RNA Polymerase II, c-JUN, SLPI

## Diskussion

induziert und AGT, MKP, PECK, TAT sowie CEBPA reprimiert. Mit Ausnahme von IKK (IkappaB-Kinase), welches im Zytoplasma lokalisiert ist, befinden sich alle weiteren regulierten Gene und Proteine im Zellkern.

Für HCCs wurde berichtet, dass GR im Zytosol vorgefunden wird [Ho et al., 2002]. Ferner wurde GR als ein unabhängiger Prognosefaktor benutzt. So korreliert die Identifikation von GR im Zytosol mit einer geringeren Überlebensrate als bei HCC-Patienten ohne GR im Zytosol. GR im Kern verringert die Regulation von Genen für die Entzündungsantwort, wie den Zytokinen, durch die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [Adcock und Barnes, 2008].

In dysplastischem Gewebe von sechs Monate alten transgenen Tieren und im Tumorgewebe von zwölf Monate alten transgenen Tieren sind die Gene *Nrp1*, *Blnk*, *Pck1*, *Mik67ip*, *Mybbp1a*, *Il13ra1*, *Nhp1*, *5730408K05Rik*, *Ctps*, *Cebpa*, *Nol5a*, *Gjb2*, *Hist1h2ab*, *D19Wsu12e*, *Lpl* und *Ttc27* reguliert. Diese Gene sind in den PPAR-Signalweg involviert und wurden ferner in der Krankheit Alzheimer als reguliert identifiziert. Ebenso sind diese Gene in der Regulation des Zitrat Zyklus, im Pyruvat-, Glycerolipid- und Pyrimidin-Metabolismus, im B-Zellen-Rezeptorsignalweg, im Adipozytokin-Signalweg, in der Zellkommunikation, im Signalweg zur axonalen Orientierung, im Insulin-Signalweg, im Jak-STAT-Signalweg und in der Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion eingeschlossen. Für das Gen *Nrp1* ist bekannt, dass es beim Signalweg der axonalen Orientierung reguliert ist. *Blnk* spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NF-kappa-B und NFAT, wodurch es bei der Regulation der Immunantwort, dem Fc $\gamma$ RIIB-Signalweg in B-Lymphozyten und der BCR-induzierten B-Zell-Apoptose von Bedeutung wird [Fu et al., 1998; Minegishi et al., 1999; Taguchi et al., 2004; Grabbe und Wienands, 2006].

Das Gen *Pck1* ist im Zitrat Zyklus, in der TR/RXR-Aktivierung, im Östrogenrezeptor-Signalweg, im Pyruvat-Metabolismus und im Glucocorticoid-Rezeptor-Signalweg beteiligt. Für die regulierten Gene *Mik67ip*, *Mybbp1a*, *Nhp1*, *5730408K05Rik*, *Nol5a*, *Gjb2*, *Hist1h2ab*, *D19Wsu12e* und *Ttc27* ist keine Rolle in einem anerkannten Netzwerk bekannt.

*Il13ra1* ist im IL-4-Signalweg beteiligt. Das Gen *Ctps* ist im Pyrimidin-Metabolismus reguliert. Es ist bekannt, dass das Gen *Cebpa* in den Signalwegen des Glucocorticoid-Rezeptors, der Tight Junction und der VDR/RXR-Aktivierung eine Rolle spielt. Das Gen *LPL* schließlich reguliert die LXR/RXR-Aktivierung, den Glycerolipid-Metabolismus und die PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ -Aktivierung.

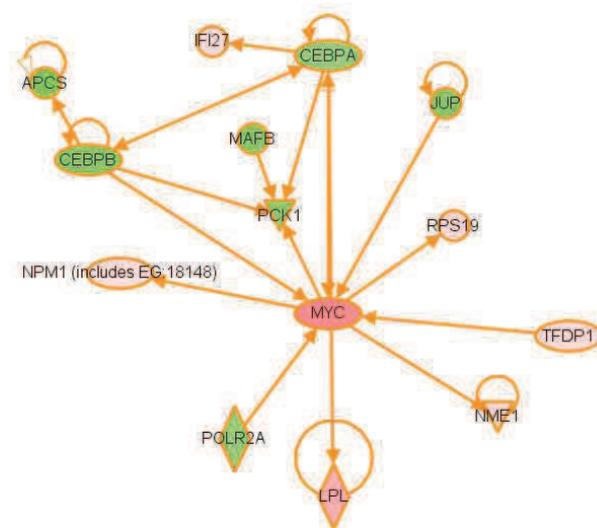
Zu den Netzwerken mit den am meisten herabregulierten Genen gehören das Komplementsystem und die Antigenpräsentation. Die Mehrheit der Gene, die in diesen

## Diskussion

Stadien nicht reguliert werden, gehört zu den Signalwegen der NRF2-vermittelten oxidativen Stressantwort, zum IL-10-Signalweg und zu den Signalwegen der Apoptose. Bei der Analyse der zwölf Monate alten transgenen Tiere mit HCC ist zu beobachten, dass die meisten regulierten Signalwege den Retinoidsäurerezeptor beinhalten.

In zwölf Monate alten transgenen Tieren sind die unterschiedlich exprimierten Signalwege, die der Akutphase-Antwort, die LPS/IL-1-abhängige Inhibition der RXR-Funktion, das Komplement-System, das Gerinnungs-System, die Antigen darstellung, der Metabolismus der Xenobiotika durch Zytochrom P450 und die FXR/RXR-Aktivierung in Beziehung. Alle Gene, die in diesen Signalwegen exprimiert sind, wurden mit der Ingenuity Pathway Analysis Software analysiert. In den sechs Monate alten transgenen Tieren konnten neun Gene gefunden werden, die in den regulierten Signalwegen eine Rolle spielen. Bei den neun Genen handelt es sich um TFDP1, POLR2A, MYC, NME1, PCK1, CEBP $\alpha$  und CEBP $\beta$ , LPL und APCS. Diese Gene haben ferner eine Rolle in den Signalwegen des Glucocorticoid-Rezeptors, der Zellzyklus-G1/S-Phase- „Checkpoint“-Regulation, der Akutphase-Antwort, der LXR/RXR-, VDR/RXR- und TR/RXR-Aktivierung und dem Pyrimidin-Metabolismus. Alle neun Gene stehen untereinander in Verbindung. In der Mitte dieser Verbindungen steht das Gen MYC.

MyInteraktion6Monate



© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abb. 5.5: Ingenuity Pathway Analyse für sechs Monate alte transgene Tiere

In zwölf Monate alten transgenen Tieren stehen 69 der regulierten Gene mit dem Signalweg der Akutphase-Antwort, der LPS/IL-1-abhängigen Inhibition der RXR-Funktion, dem Komplement-System, dem Koagulation-System, dem Metabolismus der Xenobiotika durch

## Diskussion

Zytochrom P450 und der FXR/RXR-Aktivierung in Beziehung. Alle 69 Gene stehen untereinander in Verbindung.

In sechs Monate alten transgenen Tieren sind die meisten regulierten Gene in den Signalwegen des Glucocorticoid-Rezeptors und der Zellzyklus-G1/S-Phase- „Checkpoint“-Regulation zu finden.

Die sechs und zwölf Monate alten transgenen Tiere zeigen unterschiedliche Genexpressionen, insbesondere für den Signalweg der Akutphase-Antwort. Dieser Signalweg scheint einer der Signalwege zu sein, die den Schalter zwischen atypischem Gewebe/Dysplasie und HCC umlegen. Weitere Signalwege, die zwischen entartetem Gewebe und maligner Transformation entscheidend sind und folglich die Tumorigenese kontrollieren, sind die LPS/IL-1-abhängige Inhibition der RXR-Funktion, die PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ -Aktivierung und die FXR/RXR-Aktivierung.

Die am stärksten durch signifikant regulierte Gene beeinflussten Signalwege bei sechs Monate alten transgenen Tieren sind der Glucocorticoid-Rezeptor-Signalweg, die Zellzyklus-G1/S-Phase-Checkpoint-Regulation, der Pyrimidin-Metabolismus, der Östrogenrezeptor-Signalweg, der Signalweg des zirkadianen Rhythmus, der Panthothenate und CoA-Biosynthese, der Purin-Metabolismus und der JAK/STAT-Signalweg.

Der Vergleich der signifikant regulierten Gene aus zwei, sechs und zwölf Monate alten transgenen Tieren zeigt die größten regulatorischen Unterschiede im G1/S-Phase-Übergang des Zellzyklus, der FXR/RXR-Aktivierung, dem Fettsäuremetabolismus, der LPS/IL-1-abhängigen Inhibition der RXR-Funktion und der Aktivierung von positiven Akutphase-Antwort-Proteinen.

Der Signalweg, der in Tieren mit HCC durch signifikant regulierte Gene am stärksten beeinflusst wird, ist der Signalweg der Akutphase-Antwort, der eine schnelle Entzündungsantwort gibt. Proteine, die in der Akutphase-Antwort nicht reguliert sind, besitzen ferner eine generelle Funktion in der Komplement-Aktivierung. Der Signalweg der Akutphase-Antwort reguliert den der Komplement-Aktivierung, welcher ebenfalls viele signifikant regulierte Gene von zwölf Monate alten transgenen Tieren beinhaltet.

Der Glucocorticoid-Rezeptor-Signalweg induziert die Transkription anti-inflammatorischer Gene durch die Repression von inflammatorischen Genen. Das monomere GR kann die Transkription der nuklearen Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- $\kappa$ B und NF-AT reprimieren. GR wird im Zytosol der meisten HCCs gefunden und dient als unabhängiger prognostischer

## Diskussion

Faktor für HCC nach einer Resektion. Patienten mit GR-positivem HCC haben eine geringere Überlebensrate als Patienten mit GR-negativem HCC [Ho et al., 2002]. In nicht kanzerogenem Gewebe wurde GR nur in geringer Menge gefunden [Lui et al., 1993]. Die Microarray-Ergebnisse von sechs Monate alten transgenen Tieren zeigt eine hohe Expression von Genen, die den Glucocorticoid-Rezeptor-Signalweg im Kern schwächen. In zwölf Monate alten transgenen Tieren waren diese regulierenden Gene sowohl induziert als auch reprimiert exprimiert und konnten im Kern und im Zytoplasma lokalisiert werden. Ferner wurde auf der Proteinebene die Verteilung ersichtlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des Glucocorticoid-Rezeptors in Kernextrakten von zwei bis elf Monate alten transgenen Tieren abnimmt. Die Konzentration des Glucocorticoid-Rezeptors im Gesamtproteinextrakt von zwei und sechs Monate alten transgenen Tieren war nahezu identisch, während in zwölf Monate alten transgenen Tieren die Konzentration geringer war.

Dies weist auf eine veränderte Regulation des Glucocorticoid-Rezeptors sowohl auf der Proteinebene als auch auf der mRNA-Ebene hin. Außerdem deutet eine Deregulation des Glucocorticoid-Rezeptor-Signalweges auf die Modifikation von der Dysplasie zum hepatozellulären Karzinom hin.

Es wurde nachgewiesen, dass HGF *c-MYC*-mRNS und -Protein in primären Medulloblastoma-Zellen induziert. Das HGF reguliert die *c-MYC*-Konzentration durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen, was durch die von HGF induzierte *c-MYC*-Promotoraktivität und durch die Induktion der Proteinkonzentration von *c-MYC* bewiesen wurde. Es konnte ferner ermittelt werden, dass HGF die Zellzyklusprogression fördert und die Zellproliferation, die Apoptose sowie das Wachstum der Zellgröße in einer *c-MYC*-abhängigen Weise induziert. Zudem konnten in Medulloblastome Xenografts morphologische Ähnlichkeiten zwischen einer HGF- und *c-MYC*-Überexpression beobachtet werden [Li et al., 2008]. Dies zeigt, dass es eine bedeutende biologische Verbindung zwischen HGF und *c-MYC* in der Malignität gibt. Diese molekularen und funktionalen Interaktionen führten dazu, dass im Rahmen dieser Arbeit die neuen *c-MYC*-Zielgene in HGF-behandelten HepG2-Zellen untersucht wurden. Die HepG2-Zellen zeigten eine induzierte Expression von *c-MYC*-mRNS und eine erhöhte MYC Konzentration. Die HGF-behandelten HepG2-Zellen zeigten außerdem eine Regulation der potentiellen MYC-Zielgene, was auch die EMSA-Ergebnisse untermauert. Die Regulation der potentiellen MYC-Zielgene in einer *c-MYC*-

## Diskussion

überexprimierenden Zelllinie deutet auf eine Verbindung zwischen c-MYC und den neu identifizierten Zielgenen hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese neu identifizierten MYC-Zielgene in einer großen Vielfalt von Signalwegen und regulatorischen Netzwerken involviert sind. All diese Signalwege wurden zuvor mit MYC verknüpft. Die Identifikation der sieben neuen MYC-Zielgene kann einen Einblick geben, wie die Interaktion und Regulierung zwischen diesen verschiedenen Signalwegen abläuft.

### 5.6 Durch Myc kontrolliertes mRNS-Spleißen

Die Exon Array-Analyse ermöglicht neben der Identifikation von signifikant regulierten Genen auch die Identifikation von alternativen Spleiß Varianten. Neben Veränderungen in der Genexpression scheinen epigenetische Mechanismen sowie das alternative Spleißen eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung zu spielen [Revil et al., 2006, Berasain et al., 2010, Herceg et al., 2011 und Liu et al., 2014], auch wenn die pathogenen Mechanismen noch nicht abschließend aufgeklärt sind. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, konnten zeigen, dass die im Exon Array regulierten Gene (veränderte Genexpression sowie alternatives Spleißen) eine Übereinstimmung bei den GO-Kategorien sowie bei den regulierten Signalwegen besitzen und eine wichtige Rolle in der Tumorigenese spielen. Ferner konnten durch Sequenzierungen alternative Spleiß Varianten bestätigt werden.

Die Exon Arrays wurden auf eine veränderte Genexpression untersucht. Ferner wurde von diesen Genen eine Cluster-Analyse, eine Analyse der Gen-Ontologie und der Signalwege durchgeführt. Gene, die Unterschiede in ihren Exon-Konzentrationen und somit ein mögliches Spleiß Ereignis aufwiesen, wurden auf alternatives Spleißen analysiert und ebenfalls einer Analyse der Gen-Ontologie und der Signalwege unterzogen. Mittels quantitativer RT-PCR wurden die Veränderungen in der Genexpression verifiziert. Mögliche Spleiß Varianten wurden mittels qRT-PCR, Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung bestimmt.

Es hat sich gezeigt, dass im Vergleich zu nicht transgenen Tieren die transgenen Tiere ohne morphologische Veränderungen 1179, die transgenen Tiere mit Dysplasie 925 und die transgenen Tiere mit HCC 842 deregulierte Gene besitzen. Dies zeigt, dass bereits die Transgenität einen starken Einfluss auf die Genregulation der Tiere besitzt, was bereits zuvor bei der Genexpressionsanalyse festgestellt werden konnte (siehe Seite 150). Dieses Bild zeichnet sich auch bei den Genen mit unterschiedlichem Exongebrauch ab. Hier gibt es bei

## Diskussion

transgenen, morphologisch gesunden Tieren 486, bei transgenen Tieren mit Dysplasie 266 und bei Tieren mit HCC 389 Gene mit alternativem Exongebrauch.

Dieser Abschnitt der Arbeit befasst sich im Wesentlichen mit dem alternativen Spleißen in der sequenziellen Tumorentwicklung, daher wurden Gene analysiert, die Spleiß Faktoren beziehungsweise Teile der Spleißosomen kodieren. So konnten in transgenen Tieren 25, in Tieren mit Dysplasie 15 und in Tieren mit HCC 20 dieser Gene gefunden werden, die signifikant reguliert wurden. Diese Gene sind folgende:

Kontrolle = Atp13a3, Bcas2, Ccn1, Cdk12, CsdA, Dbr1, Dhx33, Eftud2, Isy1, Ppp1r13b, Rbbp6, Rps7, Rpl14, Sf3b3, Smu1, Srpk2, Trpt1, Txnl4a, Usp39, Wdr86, Zbtb4, Zfp830

Dysplasie = Cdc5l, Clk3, Clk4, Ddx17, Ppp1r13b, Rps13, Rpl14, Setd2, Sfrs8, Snrpn, Supt3h, Txnl4a, Usp39, Wdr86, Zfp830

Tumor = Atp13a3, Bcas2, Cdk12, Ddx17, Ddx46, Eftud2, Luc7l2, Plekhj1, Ppp1r13b, Rbbp6, Rbm17, Rbm38, Rps13, Sf3b3, Srpk2, Txnl4b, Usp39, Wdr86, Zfp830

### 5.6.1 Analyse auf alternative Spleiß Ereignisse

Bei der Auswahl der analysierten Gene (Mybbp1a, Ankfy1, Arnt2, Aukb, Btbd1, Cad, Chmp1a, Dock7, Eef1a1, Gata4, Itr2, St6gal1, Stat1, Tfdp1, Txlna und Ugt1a6a) wurden verschiedene Voranalysen durchgeführt. Zuerst fand eine Beurteilung der mit Xray (Excel® Array Analysis) Software (Biotique Systems) statistisch errechneten Gene mit alternativem Exongebrauch statt. Hierbei wurden sowohl Gene mit signifikant unterschiedlicher Genexpression als auch Gene, die sich nicht signifikant unterscheiden, analysiert. Sieben der 16 untersuchten Gene wiesen eine signifikante Genexpression auf. Da die pathogenen Mechanismen bei der Tumorentwicklung, wie zuvor erläutert, noch nicht abschließend aufgeklärt sind, sollte durch diese gemischte Analyse keine Einschränkung gemacht werden. Eine weitere Auswahl fand über bereits entdeckte Spleiß Varianten statt. Von den 16 untersuchten Genen sind bereits acht in der Literatur bekannt. Eine weitere Analyse zur Vorauswahl der Gene war die computergestützte Analyse des CBS (Center for Biological Sequence Analysis) mit dem Programm HMMgene (vgl. 1.1), welches ähnlich wie die TRANSFAC®-Datenbank den Promotorbereich und den kodierenden Sequenzbereich auf in diesem Fall potentielle Spleiß Varianten und nicht auf Bindestellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. Wie es bekannte TF-Bindestellen gibt, so gibt es auch bekannte Spleißstellen, die in Enhancer- und Silencer-Elemente unterschieden werden [Graveley et al., 2000; Jensen et

## Diskussion

al., 2009]. Im Gegensatz zu der TRANSFAC®-Datenbank ist die gewählte Matrix des HMMgene-Programms unbekannt. Der Promotorbereich wurde wie zuvor auf 3000 bp upstream und 100 bp downstream festgelegt. Acht der ausgewählten 16 Gene zeigten in ihrer ungespleißten Gensequenz eine Prognose auf ein alternatives Spleiß Ereignis. Zwei dieser Gene besitzen obendrein eine mögliche Annahme auf ein solches Ereignis im Promotorbereich 3000 bp upstream. Das Gen (*Chmp1a*) zeigt ein mögliches alternatives Spleiß Ereignis im Bereich 3000 bp upstream, aber nicht in der ungespleißten Sequenz des Gens an.

Die endgültige Aussage über alternatives Spleißen wurde anhand der PCR-Analyse mit anschließender Agarosegelelektrophorese und Sequenzanalyse getroffen. Lediglich die Sequenzierung der Gene *Arnt2* und *Btbd1* lässt auf ein alternatives Spleiß Ereignis schließen. Alle weiteren Sequenzierungen ergaben keine Unterschiede im Hinblick auf alternativen Exongebrauch. Diese geringe Anzahl an bestätigten Spleiß Ereignissen (zwei von 16[15]) deutet auf einen methodischen Fehler hin. Zusätzlich ist durch die Qualität des Ausgangsmaterials, welches sich mit jeder weiterführenden Aufarbeitung und Amplifikation verschlechtert, auch die Qualität der Sequenzierung betroffen. Beim Ausgangsmaterial wurde eine RNS mit einem RIN (*RNA integrity number*) von mindestens vier für die Exon Array-Analyse ausgewählt. Die Werte können zwischen eins und zehn liegen, wobei zehn die höchste Qualität besitzt. Die RNA wurde aus Gewebeschnitten aufgearbeitet, die nach morphologischem Befund getrennt isoliert und mittels Lasermikrodissektion gewonnen wurden. Für die Exon Array-Analyse wurde ein Teil der RNA verwendet, der Rest wurde für die Validierung der Exon Arrays und der Spleiß Ereignisse benutzt. Für die Analyse der Spleiß Ereignisse musste die RNA eine cDNS-Synthese-Reaktion, die qRT-PCR-Reaktion mit anschließender Agarosegelelektrophorese, die Gelextraktion mit Aufreinigung und die Sequenzier-PCR durchlaufen. Diese weiterführende Aufarbeitung könnte der Integrität der RNA weiter geschadet haben. Auch, wenn die qRT-PCR so empfindlich ist, dass diese bereits Basenpaarunterschiede ersichtlich machen kann, wird hierauf kein Augenmerk gelegt, da die zuvor genannten Schritte es sehr wahrscheinlich machen, dass diese Unterschiede aufgrund der Aufarbeitung entstanden sind. Um Spleiß Ereignisse allerdings sicher zu bestätigen, werden frische Proben benötigt, die nicht aufgrund ihrer mannigfaltigen Behandlungen in ihrer Qualität beeinträchtigt sind. Die beiden identifizierten Spleiß Varianten von *Arnt2* und *Btbd1* sind aufgrund unterschiedlicher Sequenzergebnisse identifiziert worden. Auch für diese beiden Gene gibt es keine 100-prozentige Sicherheit auf ein alternatives Spleiß Ereignis, da die Ergebnisse lediglich auf einer Ja/Nein-Antwort basieren, wobei ein Primer Paar eine

## Diskussion

Sequenz amplifiziert und ein anderes nicht bzw. ein Primer Paar ein Amplifikat bei einem Gewebe erzielt und bei einem anderen nicht. Auch diese Ergebnisse können aufgrund der Qualität der RNA entstanden sein, allerdings erscheint dies unwahrscheinlich, da Amplifikate erzeugt werden konnten. Eine weitere Methode, um bei der PCR alternative Spleiß Ereignisse zu identifizieren, besteht in einer anderen Art von positiv/negativ-Ergebnissen. So lassen sich bei der qRT-PCR auch lineare Amplifikationen erkennen. Lineare Amplifikationen entstehen, wenn z. B. nur ein Primer Paar an das Template bindet und so in den Folgerunden der PCR keine exponentielle Amplifikation stattfinden kann. Bei der Zyklenzahl von 30 und einer Ausgangsmenge von 100 ng cDNS kann so in der Agarosegelelektrophorese im besten Fall eine leichte Bande identifiziert werden, die dann für die folgende Aufarbeitung für die Sequenzierung nicht ausreichend wäre. Im Light Cycler selbst ist eine lineare Amplifikation meist nicht vom Hintergrundrauschen abzutrennen. In Anbetracht der Qualität des Ausgangsmaterials wurde daher bei der Analyse und Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse auf diese Möglichkeit eingegangen.

Abschließend lässt sich für die Analyse auf alternative Spleiß Ereignisse mittels Exon Arrays feststellen, dass die Aussagekraft der Ergebnisse stark vom Ausgangsmaterial abhängig ist. Bei der Auswertung der Exon Arrays ist die zusätzliche visuelle Kontrolle der Gene mit Xray (Excel® Array Analysis) Software (Biotique Systems) wichtig, da mit der Software falsch positive Ergebnisse nicht automatisch ausgesondert werden können. Mit zwei bestätigten Spleiß Varianten von 16 untersuchten Genen erscheint die Methode der Exon Array-Analyse auf alternatives Spleißen eine wenig Erfolg versprechende zu sein. Dies wurde bereits bei einer „whole genome exon array“-Analyse von Gardina und Mitarbeitern [Gardina et al., 2006] im Dickdarmkrebs festgestellt, hier war lediglich ein Drittel der untersuchten alternativen Spleiß Ereignisse in der PCR-Validierung wirklich positiv. Mit einer besseren Qualität des Ausgangsmaterials besteht aber die Möglichkeit, die Aussagekraft der Exon Arrays hinsichtlich alternativer Spleiß Ereignisse zu steigern.

Das Gen Aurkb, welches als Kontrollgen dienen sollte, zeigte ferner kein alternatives Spleiß Ereignis, auch wenn es laut Literatur in HCC und Lebererkrankungen auftreten sollte. Bei der computergestützten Analyse der Gene war Aurkb ebenfalls nicht auffällig. Zwei von acht prognostizierten Genen waren bei der computergestützten Analyse positiv. Dabei wurde in diesem Fall nur die ungespleißte Gensequenz bewertet. Die 3'-und 5'-flankierenden Regionen scheinen für die Analyse auf alternative Spleiß Ereignisse nicht ausschlaggebend zu sein. Mit drei Genen, die in diesem Bereich bei der computergestützten Analyse Auffälligkeiten zeigten, ist die Anzahl aber zu gering, um eine stichhaltige Aussage treffen zu können. In der

## Diskussion

Veröffentlichung von Gardina und Mitarbeitern [Gardina et al., 2006] wurde im Dickdarmkrebs eine Exon Array-Analyse durchgeführt und die dabei festgestellten potentiellen alternativen Spleiß Varianten mit einer computergestützten Analyse (EST BLAST mRNA) verglichen. Von den in der Exon Array-Analyse identifizierten Top 200 Genen mit alternativem Exongebrauch ließen sich auch 169 Gene mittels bioinformatischer Analyse wiederfinden.

Generell scheint die computergestützte Analyse im Bereich der ungespleißten Gensequenz auf alternatives Spleißen über eine ähnlich starke Aussagekraft zu verfügen wie die Exon Array-Analyse. Allerdings ist auch für diese Aussage die Anzahl der untersuchten Gene zu gering, um eine signifikante Bewertung durchzuführen. In Anbetracht der Tatsache, dass diese Methode kostenfrei zur Verfügung steht, ist sie zweifelsfrei eine sinnvolle Alternative, die sich für eine Validierung anbietet. Ergänzt man die Analyse mit dem HMMgene-Programm mit weiteren computergestützten Analysen [Wang et al., 2003; Kirschbaum-Slager et al., 2005; Hui et al., 2004], so besteht die Möglichkeit, eine aussagekräftigere Analyse zu bekommen. Für eine effektivere Untersuchung wäre es jedoch hilfreich, die untersuchten Matrizen beim Analyseprogramm HMMgene zu kennen und sie den gegebenen Anforderungen anzupassen, wie dies bei der Analyse mit der TRANSFAC®-Datenbank auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen der Fall ist. So wäre es nicht nur möglich, Donor- und Akzeptorsequenzen („donor“ und „acceptor site“) zu untersuchen, sondern auch „Enhancer“- und „Silencer“-Elemente (verstärkende und unterdrückende Elemente).

Bis heute sind die Mechanismen, die für die veränderten prä-mRNS-Spleiß Muster im Leberkrebs verantwortlich sind, nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass die Mutation der Spleißstellen oder Spleißenhancer und –silencer-Sequenzen diese bewirken. Auch werden die abnormale Expression von Spleiß Faktoren und die Aktivierung von Signalwegen, die die Aktivität der Spleiß-Maschinerie bewirken, für das veränderte Spleiß Muster angenommen [Srebrow et al., 2006; Blaustein et al., 2007; Karni et al., 2007; Kim et al., 2008; Grosso et al., 2008; Pettigrew et al., 2008; Körner et al., 2009 und David et al., 2010]. Die größte Herausforderung wird weiterhin darin bestehen festzustellen, ob das alternative Spleißen die Ursache oder die Folge des Leberkrebses ist. Aus diesem Grund wird es wichtiger, ein System einzusetzen, in dem ein sich schrittweise entwickelnder Leberkrebs zu beobachten ist, wie z. B. das Aat-Myc-Mausmodell, und zusätzlich Transfektionsversuche mit potentiellen Spleiß Varianten durchzuführen.

## Diskussion

Nicht nur der Mechanismus des alternativen Spleißens ist nicht abschließend aufgeklärt, auch die Anzahl der Gene mit alternativem Spleißens ist nicht genau belegt. So gibt es Vermutungen, die basierend auf „expressed sequence tag“ (EST)-Daten von 35-40 % der Gene ausgehen [Mironov, A.A. et al., 1999 und Modrek, B. und Lee, C. 2002]. Daten, die auf Microarray-Experimenten und Hochdurchsatz-Sequenzierung basieren, weisen dagegen auf bis zu 95 % hin [Pan et al., 2008]. Melamud und Moulton [2009] haben über eine stochastische Analyse einen Wert von 90 % errechnet, ferner haben sie ermittelt, dass von den 90 % der alternativ gespleißten Gene die Mehrzahl drei bis sechs Isoformen besitzt. Allerdings haben nicht alle dieser alternativ gespleißten Isoformen auch eine Funktion inne. Eine funktionelle Bedeutung für das alternative Spleißens konnte für die Regulation der Expression und für die Erzeugung von Proteinfunktionsunterschieden nachgewiesen werden [Zhu et al., 2003; Lamba et al., 2003; Relógio et al., 2005 und Wittmann et al., 2006]. Auch konnten zehn bis 30 % der alternativen Spleiß Ereignisse als gewebespezifisch [Noh et al., 2006] und rund zehn bis 20 % als konserviert zwischen den Spezies belegt werden [Nurtdinov et al., 2003; Modrek und Lee, 2003; Thanaraj et al., 2003; Pan et al., 2005 und Sorek et al., 2006]. Die Mehrheit der Isoformen ist aber weder konserviert zwischen den Spezies noch gewebespezifisch und wurde von Melamud und Moulton [2009] als Produkte von „noisy splicing“ postuliert. Diese Hypothese wurde durch fünf Punkte untermauert, zum Ersten durch die Tatsache, dass die Anzahl der alternativen Spleiß Ereignisse mit der Expression eines Gens und der Anzahl der Introns des Gens ansteigt. Zum Zweiten, dass nur eine geringe Anzahl der Isoformen in zwei oder mehr Spezies gefunden wurde und ferner keine Gewebespezifität zeigten. Als dritte Tatsache wird angeführt, dass für 34 % der Gene angenommen wird, ein Teil der „Nonsense-mediated mRNA Decay“ (NMD) zu sein, welches ein Kontrollmechanismus ist, der in eukaryotischen Zellen unerwünschte (vorzeitige) Stoppkodons in der mRNA erkennt und deren Expression als verkürzte Proteine verhindert [Lewis et al., 2003]. Viertens wird angeführt, dass die Proteinsequenzen aus den alternativen Isoformen keine lebensfähigen Strukturen entwickeln können [Tress et al., 2007 und Melamud und Moulton, 2009]. Als fünften Punkt, der die Hypothese untermauern soll, geben die Autoren an, dass die Fehlerzahl mit der Anzahl der Introns in einem Gen und dem Expressionsniveau sinkt. Diese Tatsachen wurden in einem von ihnen postulierten Modell berücksichtigt [Melamud und Moulton, 2009]. Dieses Modell kann den Trend der Daten erklären und berücksichtigt die Anzahl der Introns und die Expression. Dabei wurde angenommen, dass Gene mit vielen Introns keine hohe Fehlerrate tolerieren können, da dies einen erheblichen Verlust des Hauptproduktes bedeuten würde. Ferner könne die Zelle eine hohe Fehlerrate bei einem hoch exprimierten Gen nicht tolerieren,

## **Diskussion**

da die große Anzahl der falsch oder gar nicht gefalteten Proteinprodukte für die Zelle toxisch wäre. Welche Funktion dem „noisy splicing“ allerdings zufällt, ist noch ungeklärt.

### **5.7 Analyse der Gen-Ontologie**

Bei der Analyse der Gen-Ontologie konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Krankheitsstadien identifiziert werden. In dieser Arbeit wurden die biologischen Prozesse und die molekularen Funktionen in zwei, sechs und zwölf Monate alten Tieren sowie in Kontroll-, Dysplasie- und Tumorgewebe angesehen. Bei letzteren Gewebearten wurde ferner zwischen Expressionslevel und alternativem Exongebrauch der Gene unterschieden. Diese Analyse zwischen den untersuchten Krankheitsstadien zeigte lediglich marginale Unterschiede in mehreren verschiedenen Bereichen. Um auszuschließen, dass das Expressionslevel der Gene einen Einfluss auf die Gen-Ontologie hat, wurden für zwölf Monate alte transgene Tiere und Tumorgewebe (Expressionslevel und alternativer Exongebrauch) separate Gen-Ontologie-Diagramme der positiv und negativ regulierten Gene angelegt. Auch diese Unterscheidung zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen den verschiedenen Analysen. So untermauert diese Analyse die These, dass bei der Tumorentstehung eine Vielzahl von Bereichen, in diesem Fall durch Myc, dereguliert ist und erst die Vielzahl dieser Deregulationen dazu führt, dass ein unwiderrufliches Krankheitsbild, der Leberkrebs, entsteht. Ferner zeigt die Analyse, dass selbst im Leberkrebs die biologischen Prozesse und molekularen Funktionen weiterhin denen entsprechen, die auch in gesundem Gewebe vorliegen.

## **Ausblick**

### **6. Ausblick**

Das transgene Mausmodell hat sich als ein ideales Modell für die Leberkrebsentstehung erwiesen. In den vorausgegangenen Untersuchungen wurden hauptsächlich transkriptionelle Veränderungen untersucht. Die Untersuchung auf posttranskriptionelle Modifikationen wurde mit der Analyse alternativer Spleiß Varianten begonnen. Eine Fortsetzung dieser Analyse erscheint als aussichtsreich und sinnvoll. Eine Analyse der postulierten Spleiß Varianten Arnt2 und Btbd1 wäre sehr aufschlussreich. Diese sollten klären, ob diese Spleiß Varianten eine Funktion erfüllen oder nonsense-Transkripte sind. Ferner sollten auf Basis der computergestützten Analyse weitere Gene für eine detaillierte Untersuchung auf alternatives Spleißen ausgewählt werden. Hierzu sollten auch Daten anderer Mausmodelle oder humane Daten einbezogen werden. Des Weiteren sollte im Mausmodell, an welchem im Rahmen der vorliegenden Arbeit geforscht wurde, auch eine miRNA-Analyse vorgenommen werden, um weitere Aspekte der posttranskriptionellen Regulation untersuchen zu können. Die daraus gewonnenen Daten könnten weitere Ansatzpunkte für eine schnellere Erkennung des Leberkrebses bieten und überdies Ansatzpunkte für Therapien eröffnen. Nicht außer Acht gelassen werden sollte die Tatsache, dass das verwendete Mausmodell einen idealen Testorganismus für die Erprobung neuer Medikamente in der Leberkrebstherapie bietet.

## Literatur

### 7. Literatur

- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS et al. (1985) The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. 1985 Dec 12-18;318(6046):533-8.
- Adcock IM, Barnes PJ (2008) Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest*. 2008 Aug;134(2):394-401.
- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282 (5739): 615-616.
- Adhikary S, Eilers M (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Aug;6(8):635-45.
- Ahmadiyah N, Pomerantz MM, Grisanzio C, Herman P, Jia L et al. (2010) 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC.: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 25;107(21):9742-6. Epub 2010 May 7.
- Akagi K, Suzuki T, Stephens RM, Jenkins NA, Copeland NG (2004) RTCGD: retroviral tagged cancer gene database: *Nucleic Acids Res*. 2004 January 1; 32(Database issue): D523–D527.
- Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L, Avanzi GC (2010) TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010 May;87(5):869-75. Epub 2010 Jan 26.
- Alter MJ. (2007) Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007 May 7;13(17):2436-41.
- Amati B, Frank SR, Donjerkovic D, Taubert S (2001) Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Mar 21;1471(3):M135-45.
- Amin C, Wagner AJ, Hay N (1993) Sequence-specific transcriptional activation by Myc and repression by Max. *Mol Cell Biol*. 1993 Jan;13(1):383-90.
- Armelin HA, Armelin MC, Kelly K, Stewart T, Leder P et al. (1984) Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature*. 1984 Aug 23-29;310(5979):655-60.
- Athman R, Louvard D, Robine S (2002) The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Sep;283(3): G496-502.
- Athman R, Louvard D, Robine S (2003) Villin enhances hepatocyte growth factor-induced actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2003 Nov;14(11):4641-53. Epub 2003 Aug 22.
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):20807-10.
- Berasain C, Goñi S, Castillo J, Latasa MU, Prieto J et al. (2010) Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease: mechanisms and consequences. *World J Gastroenterol*. 2010 Jul 7;16(25):3091-102.

## Literatur

- Berasain C, Goñi S, Castillo J, Latasa MU, Prieto J et al. (2010) Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease: Mechanisms and consequences *World J Gastroenterol*. 2010 July 7; 16(25): 3091–3102.
- Bernard S, Eilers M. (2006) Control of cell proliferation and growth by Myc proteins. *Results Probl Cell Differ*. 2006;42:329-42.
- Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S et al. (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010 Feb 8;463(7283):899-905.
- Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ (2004) Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* 2004, 24: 985-996.
- Billen MJ, Squires EJ. (2009) The role of porcine cytochrome b5A and cytochrome b5B in the regulation of cytochrome P45017A1 activities. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Jan;113(1-2):98-104. Epub 2008 Dec 3.
- Blackwood EM, Eisenman RN. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 1991 Mar 8;251(4998):1211-7.
- Blaustein M, Pelisch F, Srebrow A (2007) Signals, pathways and splicing regulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:2031–2048.
- Boon K, Caron HN, van Asperen R, Valentijn L, Hermus MC et al. (2001) N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* 2001, 20: 1383-1393.
- Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G (1989) Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1989 Mar;25(3 Pt 1):267-75.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
- Bravi F, Bosetti C, Tavani A, Gallus S, La Vecchia C (2013) Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov;11(11):1413-1421.e1. Epub 2013 May 6.
- Brenner C, Deplus R, Didelot C, Lorient A, Viré E et al. (2005) Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J*. 2005 Jan 26;24(2):336-46. Epub 2004 Dec 16.
- Brooks TA, Hurley LH (2010) Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer*. 2010 Jun;1(6):641-649.
- Bull JJ, Müller-Röver S, Patel SV, Chronnell CM, McKay IA, Philpott MP (2001) Contrasting localization of c-Myc with other Myc superfamily transcription factors in the human hair follicle and during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol*. 2001 Apr;116(4):617-22.
- Buratowski S (1994) The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell*. 1994 Apr 8;77(1):1-3.

## Literatur

- Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6481-6.
- Cancer IAfRo. Globocan. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. World Health Organization; 2012:9 ([http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx) [accessed 2014]).
- Cannell IG, Bushell M (2010) Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability? *Cell Cycle*. 2010 Jul 15;9(14):2726-30. Epub 2010 Jul 27.
- Chan JA, Olvera M, Lai R, Naing W, Rezk SA et al. (2002) Immunohistochemical expression of the transcription factor DP-1 and its heterodimeric partner E2F-1 in non-Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002, 10: 322-326.
- Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 2002, 110: 19-32.
- Chen D, Zhang Z, Li M, Wang W, Li Y et al. (2007) Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 2007, 26: 5029-5037.
- Chesi M, Robbiani DF, Sebag M, Chng WJ, Affer M et al. (2008) AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell*. 2008 Feb;13(2):167-80.
- Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M et al. (2010) p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ*. 2010 Feb;17(2):236-45. Epub 2009 Aug 21.
- Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN (2014) An Overview of MYC and Its Interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 January; 4(1): a014357.
- Dalemans W, Perraud F, Le Meur M, Gerlinger P, Courtney M et al. (1990) Heterologous protein expression by transimmortalized differentiated liver cell lines derived from transgenic mice (hepatomas/alpha 1 antitrypsin/ONC mouse). *Biologicals* 1990, 18: 191-198.
- Dang CV, Le A, Gao P (2009) MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 1;15(21):6479-83.
- Dang CV, Lee WM. (1988) Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol*. 1988 Oct;8(10):4048-54.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC et al. (2006) The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 2006, 16: 253-264.
- Dang CV, Resar LM, Emison E, Kim S, Li Q et al. (1999) Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 1999, 253: 63-77.
- David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL (2010) HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*. 2010;463:364–368.
- D'Cruz CM, Gunther EJ, Boxer RB, Hartman JL, Sintasath L et al. (2001) c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):235-9.

## Literatur

- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J et al. (2011) BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011 Sep 16;146(6):904-17. Epub 2011 Sep 1.
- Ding H, Wu X, Boström H, Kim I, Wong N et al. (2004) A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR-alpha signaling. *Nat Genet*. 2004 Oct;36(10):1111-6. Epub 2004 Sep 7.
- Donninger H, Bonome T, Radonovich M, Pise-Masison CA, Brady J et al. (2004) Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene*. 2004 Oct 21;23(49):8065-77.
- Drebber U, Dienes HP. (2006) Diagnosis and differential diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Pathologe*. 2006 Jul;27(4):294-9.
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. (1999) Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev*. 1999 Oct 15;13(20):2658-69.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14863-8.
- Eisenman RN (2001) Deconstructing myc. *Genes Dev* 2001, 15: 2023-2030.
- Espina N, Lima V, Lieber CS, Garro AJ. (1988) In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. *Carcinogenesis*. 1988 May;9(5):761-6.
- Faber KN, Müller M, Jansen P (2003) Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Jan 21;55(1):107-24.
- Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC. (1994) Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann Surg*. 1994 Apr;219(4):325-31.
- Farazi PA, DePinho RA. (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006;6:674-687
- Faustino NA, Cooper TA (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*. 2003 Feb 15;17(4):419-37.
- Feld JJ, Lavoie ÉG, Fausther M, Dranoff JA (2015) I drink for my liver, Doc: emerging evidence that coffee prevents cirrhosis. Version 2. *F1000Res*. 2015 Apr 21 [revised 2015 Nov 11];4:95. eCollection 2015.
- Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S et al. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*. 2003 May 1;17(9):1115-29. Epub 2003 Apr 14.
- Fernández-Fernández L, Bellido-Martín L, García de Frutos P. (2008) Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*. 2008 Oct;100(4):604-10.
- Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S et al. (2011) Ensembl 2011. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:D800–D806.
- Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. (1998) BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity*. 1998 Jul;9(1):93-103.

## Literatur

- Gardina PJ, Clark TA, Shimada B, Staples MK, Yang Q et al. (2006) Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array.: *BMC Genomics*. 2006 Dec 27;7:325.
- Glantz S (1996) *Primer of Bio-Statistics*. 4th Edition. 1996, McGraw Hill.
- Gokhan S, Song Q, Mehler MF (1998) Generation and regulation of developing immortalized neural cell lines. *Methods* 1998, 16: 345-358.
- Goto Y, Matsuzaki Y, Kurihara S, Shimizu A, Okada T et al. (2006) A new melanoma antigen fatty acid-binding protein 7, involved in proliferation and invasion, is a potential target for immunotherapy and molecular target therapy. *Cancer Res* 2006, 66: 4443-4449.
- Grabbe A, Wienands J. (2006) Human SLP-65 isoforms contribute differently to activation and apoptosis of B lymphocytes. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3761-8. Epub 2006 Aug 15.
- Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*. 2000;6:1197–1211.
- Gregory PD, Wagner K, Hörz W. (2001) Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res*. 2001 May 1;265(2):195-202.
- Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M (2008) The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep*. 2008;9:1087–1093.
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):77-88.
- Guo QM, Malek RL, Kim S, Chiao C, He M et al. (2000) Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res* 2000, 60: 5922-5928.
- Hann SR, Eisenman RN. (1984) Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol*. 1984 Nov;4(11):2486-97.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L et al. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998 Sep 4;281(5382):1509-12.
- Henriksson M, Lüscher B (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*. 1996;68:109-82.
- Herbst A, Hemann MT, Tworkowski KA, Salghetti SE, Lowe SW et al. (2005) A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep*. 2005 Feb;6(2):177-83.
- Herceg Z, Paliwal A (2011) Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res*. 2011 May-Jun;727(3):55-61. Epub 2011 Apr 15.
- Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaioja J et al. (2002) Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell*. 2002 Sep;10(3):509-21.
- Hes.theog.521-523;Apoll.Rhod.2,1247
- Hiddemann W, Schumann J, Andreef M, Barlogie B, Herman CJ et al. (1984) Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry*.1984;5:445-446

## Literatur

- Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*. 2002 Dec;25(6):511-8.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L et al. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):180-3.
- Horiike N, Abe M, Kumagi T, Hiasa Y, Akbar SM et al. (2005) The quantification of cytochrome P-450 (CYP 3A4) mRNA in the blood of patients with viral liver diseases. *Clin Biochem*. 2005 Jun;38(6):531-4.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ et al. (1991) Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*. 1991;350:427-428.
- Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*. 2002;18 Suppl 1:S96-104.
- Hui L, Zhang X, Wu X, Lin Z, Wang Q et al. (2004) Identification of alternatively spliced mRNA variants related to cancers by genome-wide ESTs alignment. *Oncogene*. 2004;23:3013-3023.
- Humason, GL (1979) Staining hematologic elements and related tissues. In: Bartlett AC, ed. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman & Company; 1979:229-230.
- Hunecke D, Spanel R, Länger F, Nam SW, Borlak J (2012) MYC-regulated genes involved in liver cell dysplasia identified in a transgenic model of liver cancer. *J Pathol*. 2012 Dec;228(4):520-33. doi: 10.1002/path.4059. Epub 2012 Nov 6.
- Hurley LH, Von Hoff DD, Siddiqui-Jain A, Yang D (2006) Drug targeting of the c-MYC promoter to repress gene expression via a G-quadruplex silencer element. *Semin Oncol*. 2006 Aug;33(4):498-512.
- Hydbring P, Larsson LG (2010) Tipping the balance: Cdk2 enables Myc to suppress senescence. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6687-91. Epub 2010 Aug 16.
- Iakova P, Awad SS, Timchenko NA (2003) Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* 2003, 113: 495-506.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B et al. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003 Feb 15;31(4):e15 (A)
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KUJ et al. (2003) Exploration, Normalization, and Summaries of High Density Oligonucleotide Array Probe Level Data. *Biostatistics*, 4, 249-264. (B)
- Jain M, Arvanitis C, Chu K, Dewey W, Leonhardt E et al. (2002) Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science*. 2002 Jul 5;297(5578):102-4.
- Jensen CJ, Oldfield BJ, Rubio JP (2009) Splicing, cis genetic variation and disease. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:1311-1315.
- Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsher DW et al. (2001) c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* 2001, 21: 3789-3806.
- Kanai Y, Saito Y, Ushijima S, Hirohashi S (2004) Alterations in gene expression associated with the overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b,

## Literatur

- DNMT3b4, during human hepatocarcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130:636–644.
- Kang-Park S, Im JH, Lee JH, Lee YI (2006) PTEN modulates hepatitis B virus-X protein induced survival signaling in Chang liver cells. *Virus Res*. 2006 Dec;122(1-2):53-60. Epub 2006 Jul 25.
  - Karlsson A, Giuriato S, Tang F, Fung-Weier J, Levan G et al. (2003) Genomically complex lymphomas undergo sustained tumor regression upon MYC inactivation unless they acquire novel chromosomal translocations. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2797-803. Epub 2002 Nov 27.
  - Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D et al. (2007) The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:185–193.
  - Kayed H, Kleeff J, Ding J, Hammer J, Giese T et al. (2004) Expression analysis of MAC30 in human pancreatic cancer and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol*. 2004 Oct;19(4):1021-31.
  - Kel AE, Gössling E, Reuter I, Cheremushkin E, Kel-Margoulis OV et al. (2003) MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acid Res*. 2003, 31:3576-3579
  - Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P (1983) Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*. 1983 Dec;35(3 Pt 2):603-10.
  - Kent WJ (2002). BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Research*, 12(4), 656–664.
  - Kim E, Goren A, Ast G (2008) Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays*. 2008;30:38–47.
  - Kim E, Goren A, Ast G (2008) Insights into the connection between cancer and alternative splicing. *Trends Genet*. 2008;24:7–10.
  - Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL et al. (2009) HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev*. 2009 Aug 1;23(15):1743-8. Epub 2009 Jul 2.
  - Kim KR, Choi HN, Lee HJ, Baek HA, Park HS et al. (2007) A peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist induces vimentin cleavage and inhibits invasion in high-grade hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2007, 18: 825-832.
  - Kim MJ, Kim HS, Lee JK, Lee CB, Park SD (2002) Regulation of septation and cytokinesis during resumption of cell division requires uvi31+, a UV-inducible gene of fission yeast. *Mol Cells* 2002, 14: 425-430.
  - Kim S, Li Q, Dang CV, Lee LA (2000) Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 10;97(21):11198-202.
  - Kim SH, Kim M, Lee JK, Kim MJ, Jin YH et al. (1997) Identification and expression of uvi31+, a UV-inducible gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Environ Mol Mutagen* 1997, 30: 72-81.

## Literatur

- Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP (2010) Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor.:Sci Signal. 2010 Feb 2;3(107):ra8.
- Kirschbaum-Slager N, Parmigiani RB, Camargo AA, de Souza SJ (2005) Identification of human exons overexpressed in tumors through the use of genome and expressed sequence data. *Physiol Genomics*. 2005;21:423–432.
- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA et al. (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*. 1998 Nov 5;396(6706):84-8.
- Klein E, Teramoto N, Gogolák P, Nagy N, Björkholm M (1999) LMP-1, the Epstein-Barr virus-encoded oncogene with a B cell activating mechanism similar to CD40. *Immunol Lett*. 1999 May 3;68(1):147-54.
- Knoepfler PS (2007) Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer Res* 2007, 67: 5061–5063
- Kolligs FT, Bommer G, Göke B (2002) Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*. 2002;66(3):131-44.
- Körner M, Miller LJ (2009) Alternative splicing of pre-mRNA in cancer: focus on G protein-coupled peptide hormone receptors. *Am J Pathol*. 2009;175:461–472.
- Kress TR, Cannell IG, Brenkman AB, Samans B, Gaestel M et al. (2011) The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Mol Cell*. 2011 Feb 18;41(4):445-57.
- Krogh A (1997) Two methods for improving performance of an HMM and their application for gene finding. In *Proc. of Fifth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*, ed. Gaasterland, T. et al., Menlo Park, CA: AAAI Press, 1997, pp. 179-186.
- Kuramitsu M, Hamaguchi I, Takuo M, Masumi A, Momose H et al. (2008) Deficient RPS19 protein production induces cell cycle arrest in erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* 2008, 140: 348-359.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Lamba JK, Adachi M, Sun D, Tammur J, Schuetz EG et al. (2003) Nonsense mediated decay downregulates conserved alternatively spliced ABCC4 transcripts bearing nonsense codons. *Hum. Mol. Genet*. 2003;12:99.
- Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*. 1983 Aug 18-24;304(5927):596-602.
- Leder A, Pattengale PK, Kuo A, Stewart TA, Leder P (1986) Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development. *Cell*. 1986 May 23;45(4):485-95.
- Lee JK, Park EJ, Chung HK, Hong SH, Joe CO et al. (1994) Isolation of UV-inducible transcripts from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 202: 1113-1119.
- Lee TC, Li L, Philipson L, Ziff EB (1997) Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 12886-12891.

## Literatur

- Lehner F, Kulik U, Klempnauer J, Borlak J (2010) Inhibition of the liver enriched protein FOXA2 recovers HNF6 activity in human colon carcinoma and liver hepatoma cells. *PLoS One*. 2010 Oct 13;5(10):e13344.
- Levens D (2010) You Don't Muck with MYC. *Genes Cancer*. 2010 Jun 1;1(6):547-554.
- Levrero M (2006) Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*. 2006 Jun 26;25(27):3834-47.
- Lewis B, Green R, Brenner S (2003) Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 189.
- Li D, Zimmerman TL, Thevananther S, Lee HY, Kurie JM et al. (2002) Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31416-22. Epub 2002 Jun 24.
- Li HR, Wang-Rodriguez J, Nair TM, Yeakley JM, Kwon YS et al. (2006) Two-dimensional transcriptome profiling: identification of messenger RNA isoform signatures in prostate cancer from archived paraffin-embedded cancer specimens. *Cancer Res*. 2006;66:4079–4088.
- Li LH, Nerlov C, Prendergast G, MacGregor D, Ziff EB (1994) c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J*. 1994 Sep 1;13(17):4070-9.
- Li Y, Guessous F, Johnson EB, Eberhart CG, Li XN et al. (2008) Functional and molecular interactions between the HGF/c-Met pathway and c-Myc in large-cell medulloblastoma. *Lab Invest*. 2008 Feb;88(2):98-111. Epub 2007 Dec 3.
- Licatalosi DD, Darnell RB (2010) RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat Rev Genet*. 2010;11:75–87.
- Liu J, Levens D (2006) Making myc. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;302:1-32.
- Liu L, Xie S, Zhang C, Zhu F (2014) Aberrant regulation of alternative pre-mRNA splicing in hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2014;24(2):133-49.
- Lu Q, Lemke G (2001) Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):306-11.
- Lui WY, P'eng FK, Chang YF, Chang TJ, Tsai TF et al. (1993) Analysis of glucocorticoid receptors in human hepatocellular carcinoma and HepG2 cells. *Hepatology*. 1993 Nov;18(5):1167-74.
- Ma A, Moroy T, Collum R, Weintraub H, Alt FW et al. (1993) DNA binding by N- and L-Myc proteins. *Oncogene*. 1993 Apr;8(4):1093-8.
- Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA (2004) RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol* 2004, 24: 6788-6798.
- Martens AC, van den Engh GJ, Hagenbeek A (1981) The fluorescence intensity of propidium iodide bound to DNA depends on the concentration of sodium chloride. *Cytometry*.1981;2:24-25
- Matsuda Y, Ichida T (2009) Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol*. 2009 Sep;42(3):138-42. Epub 2009 Sep 26.

## Literatur

- Mazzanti R, Arena U, Tassi R (2016) Hepatocellular carcinoma: Where are we? *World J Exp Med.* 2016 Feb 20;6(1):21-36. eCollection 2016 Feb 20.
- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F et al. (2006) Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46:249-79. Epub 2006 Jul 18.
- Melamud E, Moulton J (2009) Stochastic noise in splicing machinery. *Nucleic Acids Res.* 2009 Aug;37(14):4873-86. Epub 2009 Jun 22.
- Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, Sandy P, Balasubramanian S et al. (2011) Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Oct 4;108(40):16669-74. Epub 2011 Sep 26.
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2013) PANTHER Classification System: Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols* 8, 1551 - 1566 (2013)
- Mi H, Poudel S, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD (2016) PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucl. Acids Res.* (2016)
- Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, Lederman HM, Pappu R et al. (1999) An essential role for BLNK in human B cell development. *Science.* 1999 Dec 3;286(5446):1954-7.
- Mironov AA, Fickett JW, Gelfand MS (1999) Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Res.* 1999, 9, 1288.
- Modrek B, Lee C (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet.* 2002 Jan;30(1):13-9.
- Modrek B, Lee C (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* 2002, 30, 13.
- Modrek B, Lee CJ (2003) Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat Genet.* 2003 Jun;34(2):177-80.
- Moparthy SB, Arbman G, Wallin A, Kayed H, Kleeff J et al. (2007) Expression of MAC30 protein is related to survival and biological variables in primary and metastatic colorectal cancers. *Int J Oncol.* 2007 Jan;30(1):91-5.
- Mufti SI, Eskelson CD, Odeleye OE, Nachiappan V (1993) Alcohol-associated generation of oxygen free radicals and tumor promotion. *Alcohol Alcohol.* 1993 Nov;28(6):621-8.
- Mukherji A, Janbandhu VC, Kumar V (2009) *Indian J Biochem Biophys.* 2009 Feb;46(1):37-44. HBx protein modulates PI3K/Akt pathway to overcome genotoxic stress-induced destabilization of cyclin D1 and arrest of cell cycle.
- Nakamura E, Iwakawa M, Furuta R, Ohno T, Satoh T et al. (2009) Villin1, a novel diagnostic marker for cervical adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2009 Jun;8(12):1146-53. Epub 2009 Jun 17.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 1999 May 13;18(19):3004-16.
- Neuhaus P, Wittekind C (2007) *Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts* I ISBN: 978-3-540-43016-2 (Print) 978-3-540-49821-6 (Online)

## Literatur

- Nikiforov MA, Chandriani S, Park J, Kotenko I, Matheos D et al. (2002) TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 2002 Jul;22(14):5054-63.
- Niklinski J, Claassen G, Meyers C, Gregory MA, Allegra CJ et al. (2000) Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(14):5276-84.
- Noh SJ, Lee K, Paik H, Hur CG (2006) TISA: tissue-specific alternative splicing in human and mouse genes. *DNA Res.* 2006 Oct 31;13(5):229-43. Epub 2006 Nov 14.
- Nurtdinov RN, Artamonova I, Mironov AA, Gelfand MS (2003) Low conservation of alternative splicing patterns in the human and mouse genomes. *Hum. Mol. Genet.* 2003, 12, 1313.
- O'Connell BC, Cheung AF, Simkevich CP, Tam W, Ren X et al. (2003) A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* 2003, 278: 12563-12573.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):839-43.
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 2002, 296: 1132-1136.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2001 May 1; 29(9): e45.
- Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ et al. (2006) NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 28;103(48):18261-6. Epub 2006 Nov 17. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 6;104(10):4240.
- Pan Q, Bakowski MA, Morris Q, Zhang W, Frey BJ et al. (2005) Alternative splicing of conserved exons is frequently species-specific in human and mouse. *Trends Genet.* 2005 Feb;21(2):73-7.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ and Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 2008, 40, 1413.
- Patel JH, Loboda AP, Showe MK, Showe LC, McMahon SB (2004) Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 2004, 4: 562-568.
- Patel NA, Kaneko S, Apostolatos HS, Bae SS, Watson JE et al. (2005) Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase CbetaII alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J Biol Chem.* 2005;280:14302–14309.
- Pearson K (1901) On lines and planes of closest fit to a system of points in space (PDF-Datei; 668 kB). In: *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science.* Series 6, 2, S. 559–572 (1901)
- Pettigrew CA, Brown MA (2008) Pre-mRNA splicing aberrations and cancer. *Front Biosci.* 2008;13:1090–1105.

## Literatur

- Phillips MJ, Azuma T, Meredith SL, Squire JA, Ackerley CA et al. (2003) Abnormalities in villin gene expression and canalicular microvillus structure in progressive cholestatic liver disease of childhood. *Lancet*. 2003 Oct 4;362(9390):1112-9.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM et al. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 2005 Aug 26;122(4):517-27.
- Pollard T, Ernshaw W (2008) *Cell Biology*, 2nd Edition, 2008 Chapter 23, Degradation of Cellular Components
- Pomerantz MM, Beckwith CA, Regan MM, Wyman SK, Petrovics G et al. (2009) Evaluation of the 8q24 prostate cancer risk locus and MYC expression. *Cancer Res*. 2009 Jul 1;69(13):5568-74. Epub 2009 Jun 23.
- Popov N, Schüle C, Jaenicke LA, Eilers M (2010) Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCF( $\beta$ -TrCP) antagonizes SCF(Fbw7)-mediated turnover. *Nat Cell Biol*. 2010 Oct;12(10):973-81. Epub 2010 Sep 19.
- Popov N, Wanzel M, Madiredjo M, Zhang D, Beijersbergen R et al. (2007) The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nat Cell Biol*. 2007 Jul;9(7):765-74. Epub 2007 Jun 10.
- Relógio A, Ben-Dov C, Baum M, Ruggiu M, Gemund C et al. (2005) Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4779-84. Epub 2004 Nov 16.
- Ren X, Dai M, Lin LP, Li PK, Ding J (2009) Anti-angiogenic and vascular disrupting effects of C9, a new microtubule-depolymerizing agent. *Br J Pharmacol*. 2009 Apr;156(8):1228-38. Epub 2009 Mar 19.
- Revil T, Shkreta L, Chabot B (2006) [Pre-mRNA alternative splicing in cancer: functional impact, molecular mechanisms and therapeutic perspectives]. *Bull Cancer*. 2006 Sep;93(9):909-19. Review. French.
- Reymann S, Borlak J (2008) Topoisomerase II inhibition involves characteristic chromosomal expression patterns.: *BMC Genomics*. 2008 Jul 8;9:324. (B)
- Reymann S, Borlak J (2008) Transcription profiling of lung adenocarcinomas of c-myc-transgenic mice: identification of the c-myc regulatory gene network. *BMC Syst Biol*. 2008 May 22;2:46. (A)
- Rozental R, Srinivas M, Gokhan S, Urban M, Dermietzel R et al. (2000) Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 32: 57-71.
- Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V et al. (2009) p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3207-12. Epub 2009 Feb 6.
- Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H et al. (2009) Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:10060–10065.
- Salghetti SE, Kim SY, Tansey WP (1999) Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J*. 1999 Feb 1;18(3):717-26.

## Literatur

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Schirmacher P, Prange W, Dries V, Dienes HP (2001) Hochdifferenzierte hepatozelluläre Tumoren Konzepte, Kriterien und Differenzialdiagnose Konzepte, Kriterien und Differenzialdiagnose: *Der Pathologe*; November 2001, Volume 22, Issue 6, pp 407-416
- Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C et al. (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev*. 2004 Jun 1;18(11):1263-71.
- Schuhmacher M, Kohlhuber F, Hölzel M, Kaiser C, Burtscher H et al. (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 15;29(2):397-406.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J et al. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):337-42. Erratum in: *Nature*. 2013 Mar 7;495(7439):126-7.
- Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K et al. (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*. 2000 Oct 1;14(19):2501-14.
- Sebastian T, Malik R, Thomas S, Sage J, Johnson PF (2005) C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence. *EMBO J* 2005, 24: 3301-3312.
- Sebastian T, Malik R, Thomas S, Sage J, Johnson PF (2005) C/EBPβ cooperates with RB:E2F to implement RasV12-induced cellular senescence *EMBO J*. 2005 September 21; 24(18): 3301–3312. Published online 2005 August 18.
- Shachaf CM, Felsher DW (2005) Rehabilitation of cancer through oncogene inactivation. *Trends Mol Med*. 2005 Jul;11(7):316-21. (B)
- Shachaf CM, Felsher DW (2005) Tumor dormancy and MYC inactivation: pushing cancer to the brink of normalcy. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4471-4. (A)
- Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N et al. (2006) Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol*. 2006 Nov;26(21):8022-31. Epub 2006 Sep 5.
- Sheiness D, Fanshier L, Bishop JM (1978) Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol*. 1978 Nov;28(2):600-10.
- Shiao T, Iwahashi M, Fortune J, Quattrochi L, Bowman S et al. (2000) Structural and functional characterization of liver cell-specific activity of the human sodium/taurocholate cotransporter. *Genomics*. 2000 Oct 15;69(2):203-13.
- Shin C, Manley JL (2004) Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:727–738.
- Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA et al. (2000) Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 4;97(1):228-33.
- Smedley D, Haider S, Ballester B, Holland R, London D et al. (2009) BioMart—biological queries made easy. *BMC Genomics*. 2009;10:22.

## Literatur

- Smith CM, Steitz JA (1998) Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol* 1998, 18: 6897-6909.
- Soini Y, Chia SC, Bennett WP, Groopman JD, Wang JS et al. (1996) An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. *Carcinogenesis*. 1996;17:1007–1012.
- Sorek R, Dror G, Shamir R (2006) Assessing the number of ancestral alternatively spliced exons in the human genome. *BMC Genomics*. 2006 Oct 24;7:273.
- Sotelo J, Esposito D, Duhagon MA, Banfield K, Mehalko J et al. (2010) Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 16;107(7):3001-5. Epub 2010 Jan 26.
- Srebrow A, Kornblihtt AR (2006) The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci*. 2006 Jul 1;119(Pt 13):2635-41.
- Staal-van den Brekel AJ, Dentener MA, Schols AM, Buurman WA, Wouters EF (1995) Increased resting energy expenditure and weight loss are related to a systemic inflammatory response in lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 1995 Oct;13(10):2600-5.
- Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J et al. (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):392-9.
- Stamm S (2008) Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008;283:1223–1227.
- Stanca C, Jung D, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2001) Hepatocellular transport proteins and their role in liver disease; *World J Gastroenterol*. 2001 April 15; 7(2): 157–169. Published online 2001 April 15.
- Steiger D, Furrer M, Schwinkendorf D, Gallant P (2008) Max-independent functions of Myc in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*. 2008 Sep;40(9):1084-91.
- Steiner P, Rudolph B, Müller D, Eilers M (1996) The functions of Myc in cell cycle progression and apoptosis. *Prog Cell Cycle Res*. 1996;2:73-82.
- Stoss O, Stoilov P, Daoud R, Hartmann AM, Olbrich M et al. (2000) Misregulation of pre-mRNA splicing that causes human diseases. Concepts and therapeutic strategies. In: *Gene Ther Mol Biol*. 5, 2000, S. 9-30.
- Sun Q, Zhang Y, Liu F, Zhao X, Yang X (2007) Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma through pre-cancerous expression analysis in an HBx transgenic mouse. *Cancer Biol Ther*. 2007 Oct;6(10):1532-8. Epub 2007 Jul 5.
- Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouch H, Matsui J, Tang WR et al. (2004) Deficiency of BLNK hampers PLC-gamma2 phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> influx induced by the pre-B-cell receptor in human pre-B cells. *Immunology*. 2004 Aug;112(4):575-82.
- Takeyoshi I, Yoshinari D, Kobayashi M, Kurabayashi M, Morishita Y (2005) A dual inhibitor of TNF-alpha and IL-1 mitigates liver and kidney dysfunction and improves survival in rat endotoxemia. *Hepatogastroenterology*. 2005 Sep-Oct;52(65):1507-10.
- Tanaka S, Arii S, Yasen M, Mogushi K, Su NT et al. (2008) Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Br J Surg*. 2008;95:611–619.

## Literatur

- Tanrikulu Y, Proschak E. (2004) Analyse von Microarray Genexpressionsdaten. Y Tanrikulu, E Proschak - 2004 - researchgate.net
- Tazi J, Bakkour N, Stamm S (2009) Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:14–26.
- Thanaraj TA, Clark F, Muilu J (2003) Conservation of human alternative splice events in mouse. *Nucleic Acids Res*. 2003 May 15;31(10):2544-52.
- Thomas LR, Tansey WP (2010) Proteolytic control of the oncoprotein transcription factor Myc. *Adv Cancer Res*. 2010;110:77–106.
- Tobias JW, Schrader TE, Rocap G, Varshavsky A (1991) The N-end rule in bacteria. *Science*. 1991 Nov 29;254(5036):1374-7
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J et al. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65: 87–108.
- Tress ML, Martelli PL, Frankish A, Reeves GA, Wesselink JJ et al. (2007) The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 5495.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):5116-21. Epub 2001 Apr 17. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Aug 28;98(18):10515.
- Tuupanen S, Turunen M, Lehtonen R, Hallikas O, Vanharanta S et al. (2009) The common colorectal cancer predisposition SNP rs6983267 at chromosome 8q24 confers potential to enhanced Wnt signaling. *Nat Genet*. 2009 Aug;41(8):885-90. Epub 2009 Jun 28.
- Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S et al. (2006) Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5799-804. Epub 2006 Apr 3.
- Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM (1982) Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol*. 1982 Jun;42(3):773-9.
- Vindelov LL, Christensen IJ, Jensen G, Nissen NI (1983) Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining, and internal standardization. *Cytometry*. 1983;3:332-339
- Wang GS, Cooper TA (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. 2007;8:749–761.
- Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ (1998) Myc activates telomerase. *Genes Dev*. 1998 Jun 15;12(12):1769-74.
- Wang L, Bhattacharyya N, Chelsea DM, Escobar PF, Banerjee S (2004) A novel nuclear protein, MGC5306 interacts with DNA polymerase beta and has a potential role in cellular phenotype. *Cancer Res* 2004, 64: 7673-7677.
- Wang X, Cunningham M, Zhang X, Tokarz S, Laraway B et al. (2011) Phosphorylation regulates c-Myc's oncogenic activity in the mammary gland. *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):925-36. Epub 2011 Jan 25.

## Literatur

- Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU et al. (1999) GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 3706-3711.
- Wang Z, Lo HS, Yang H, Gere S, Hu Y et al. (2003) Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative RNA splicing in human cancer. *Cancer Res.* 2003;63:655–657.
- Wasserman NF, Aneas I, Nobrega MA (2010) An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a MYC enhancer. *Genome Res.* 2010 Sep;20(9):1191-7. Epub 2010 Jul 13.
- Wayman J, O'Hanlon D, Hayes N, Shaw I, Griffin SM (1997) Fibrinogen levels correlate with stage of disease in patients with oesophageal cancer. *Br J Surg.* 1997 Feb;84(2):185-8.
- Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A et al. (2006) c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 2006 Aug 1;20(15):2096-109. Epub 2006 Jul 17.
- Wierstra I, Alves J (2008) The c-myc promoter: still Mystery and challenge. *Adv Cancer Res.* 2008;99:113-333. Review.
- Wilcox CB, Feddes GO, Willett-Brozick JE, Hsu LC, DeLoia JA et al. (2007) Coordinate up-regulation of TMEM97 and cholesterol biosynthesis genes in normal ovarian surface epithelial cells treated with progesterone: implications for pathogenesis of ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2007 Dec 11;7:223.
- Willis AE, Paulin FE, West MJ, Whitney RL (1997) Investigation of aberrant translational control of c-myc in cell lines derived from patients with multiple myeloma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997;224:269-76.
- Wittmann J, Hol EM, Jäck HM (2006) hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(4):1272-87.
- Wright JB, Brown SJ, Cole MD (2010) Upregulation of c-MYC in cis through a large chromatin loop linked to a cancer risk-associated single-nucleotide polymorphism in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2010 Mar;30(6):1411-20. Epub 2010 Jan 11.
- Wu CH, Sahoo D, Arvanitis C, Bradon N, Dill DL et al. (2008) Combined analysis of murine and human microarrays and ChIP analysis reveals genes associated with the ability of MYC to maintain tumorigenesis. *PLoS Genet* 2008, 4: e1000090.
- Yamauchi T, Keough RA, Gonda TJ, Ishii S (2008) Ribosomal stress induces processing of Mybbp1a and its translocation from the nucleolus to the nucleoplasm. *Genes Cells* 2008, 13: 27-39.
- Yasen M, Mizushima H, Mogushi K, Obulhasim G, Miyaguchi K et al. (2009) Expression of Aurora B and alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and adjacent tissue. *Cancer Sci.* 2009;100:472–480.
- Yu MC, Mack T, Hanisch R, Peters RL, Henderson BE et al. (1983) Hepatitis, alcohol consumption, cigarette smoking, and hepatocellular carcinoma in Los Angeles. *Cancer Res.* 1983 Dec;43(12 Pt 1):6077-9.
- Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV (2003) An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol.* 2003;4(10):R69. Epub 2003 Sep 11. (<http://www.myccancergene.org/index.asp>)

## Literatur

- Zhang ZY, Zhao ZR, Adell G, Jarlsfelt I, Cui YX et al. (2006) Expression of MAC30 in rectal cancers with or without preoperative radiotherapy. *Oncology*. 2006;71(3-4):259-65. Epub 2007 Jul 26.
- Zhong J, Deaciuc IV, Burikhanov R, de Villiers WJ (2006) Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Apr;1762(4):468-77. Epub 2006 Feb 13.
- Zhu J, Shendure J, Mitra RD, Church GM (2003) Single molecule profiling of alternative pre-mRNA splicing. *Science*, 2003, 301, 836.
- Zhu R, Li BZ, Li H, Ling YQ, Hu XQ et al. (2007) Association of p16INK4A hypermethylation with hepatitis B virus X protein expression in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Pathol Int*. 2007 Jun;57(6):328-36.
- Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL et al. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2424-33.
- Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C et al. (2001) Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology*. 2001 Mar;33(3):633-46.

## Verwendete Puffer

Substanz	Endkonzentration	Einwaage
β-Glycerophosphat	1M	8,64g auf 40ml H <sub>2</sub> O
poly(dI/dC)	1 µg / µl	Berechnung bei Liefermenge: 10 Units Units / mg: 13 10 Units : 13 Units / mg = 0,769 mg => Zugabe von 769µl TE- Puffer +100 mM NaCl
SDS-Laufpuffer	10 x	150 g Tris base, 720 g Glycin und 50 g SDS mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 5 l auffüllen und lösen.
RotiLoad (=1x SDS-Probenpuffer)	1x	50 µl 4x RotiLoad + 150 µl bidest. H <sub>2</sub> O
50%Sucrose / NPB-Kissen		50g Sucrose auf 100 ml mit NPB-Pufferlösung
Annealingpuffer	10x	200 µl 1 M Tris pH 7,6, 100 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> , 250 µl 2 M NaCl, mit 450 µl dH <sub>2</sub> O auffüllen.
APS	10 %	0,1 g APS in 1,0 ml bidest. H <sub>2</sub> O lösen.
Bindungspuffer (BB)	5x	625 µl 1 M HEPES pH 7,6, 125 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> , 850 µl 1 M KCl mit 3400 µl dH <sub>2</sub> O auffüllen.
Bovine γ-globulin	10 µg/µl	Berechnung: $m = c \times V$ z.B.: Zugabe von 20 ml H <sub>2</sub> O entspricht 1,57 mg/ml Endkonzentration. Für eine Endkonzentration von 10µg/µl wird die Substanz in 3,14 ml dH <sub>2</sub> O gelöst.
BSA-Stammlösung	1mg/mL	100 mg BSA mit dH <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen.
Complete™	25x	10 Tabletten mit Spatel zerkleinern und in 20ml H <sub>2</sub> O lösen
Dignam C	20 mM Hepes pH 7,9, 25 % Glycerin, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EDTA	2 ml 1M Hepes pH 7,9, 25ml 100 % Glycerin, 21ml 2M NaCl, 150µl 1M MgCl <sub>2</sub> , 40µl 0,5M EDTA auf 100 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
Dignam C+Inhibitoren	40mM β-Glycerophosphat, 1x Complete™, 1mM DTT, 1mM Natriumorthovanadat	40µl 1M β-Glycerophosphat, 40µl 25x Complete™, 1µl 1M DTT, 5µl 200mM Natrium-orthovanadat für 1 ml

## Verwendete Puffer

DNA-Ladepuffer		1,5 ml 100% Glycerin, eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau, und eine kleine Spatelspitze Xylencyanol mit 3,5 ml dH <sub>2</sub> O auffüllen.
DTT	1M	1,55g auf 10ml H <sub>2</sub> O
DTT	5M	7,71g auf 10ml H <sub>2</sub> O
EDTA	0,5M, pH 8,0	930mg auf 5ml H <sub>2</sub> O, mit NaOH Pellets pH einstellen
Ficoll	20%	2 g Ficoll mit Aqua dest auf 10 ml auffüllen
Fixierlösung		100 ml 100 % Essigsäure, 200 ml 100 % Ethanol mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen.
HCL	0,12 M	990 µl dH <sub>2</sub> O + 10 µl konz. HCL (37 %)
Hepes	1M, pH 7,6 bzw. 1M, pH 7,9	23,83g auf 100ml dH <sub>2</sub> O
Homogenisierungspuffer HP	2,2M Sucrose, 10% Glycerin, 10mM Hepes, pH 7,6, 15mM KCl, 1mM EDTA, pH 8,0	135,54g Sucrose, 18 ml 100% Glycerin, 1,8ml 1M Hepes, pH 7,6, 2,7 ml 1M KCl, 360 µl 0,5M EDTA, pH 8,0 auf 180 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
HP Inhibitoren für 180 ml	40mM β-Glycerophosphat, 1x Complete™, 1mM DTT, 1mM Natrium-orthovanadat, 0,15mM 100mM Spermine, 0,5mM Spermidine	7,2 ml 1M β-Glycerophosphat, 7,2 ml 25x Complete™, 180 µl 1M DTT, 900 µl 200mM Natrium-orthovanadat, 270 µl 100mM Spermine, 26,1 µl 3,44M Spermidine
Kaliumchlorid	1M	14,91g auf 200ml dH <sub>2</sub> O
Kupfersulfatlösung	4%	4 g CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O mit dH <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen.
Lysispuffer 3 (LP3)	40mM Tris, 5M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 4% CHAPS (w/v)	0,485g Tris base, 30,15g Harnstoff, 15,2g Thioharnstoff mit dH <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen und lösen, dann 4,0g CHAPS zugeben und lösen.
Lysispuffer 3+ (LP3+)	100 mM DTT, 0,5 % BioLyte 3-10	20 µl 5 M DTT und 5 µl BioLyte 3-10 je 1 ml LP3
Magnesiumchlorid	1M	4,76g auf 50ml dH <sub>2</sub> O
Natriumchlorid	2M	11,7g auf 100ml dH <sub>2</sub> O
Natrium-orthovanadat	200mM	0,368g auf 10ml dH <sub>2</sub> O
NPB-Pufferlösung	10 mM TrisCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 140 mM NaCl	1ml 1M TrisCl pH 7,4, 200µl 1M MgCl <sub>2</sub> und 7ml 2M NaCl auf 100 ml dH <sub>2</sub> O

## Verwendete Puffer

NPB-T+++ Pufferlösung	NPB-Pufferlösung mit Inhibitoren und Triton X100	30µl Triton x100, 240µl 1M β- Glycerophosphat, 240µl 25x Complete™, 6µl 1M DTT, 30µl 200mM Natrium- orthovanadat
PBS -		40 g NaCl, 1 g KCl, 5,75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit bidest. H <sub>2</sub> O, steril auf 5 l auffüllen.
PBS +		40 g NaCl, 1 g KCl, 5,75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g MgCL <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O, 0,5 g CaCl <sub>2</sub> mit bidest. H <sub>2</sub> O, steril auf 5 l auffüllen.
SDS	10 %	10 g SDS auf 100 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen und lösen.
SDS	20%	20 g SDS auf 100 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen und lösen.
SDS/EDTA	1 % SDS, 100 mM EDTA pH 8,0	500 µl 10 % SDS, 1 ml 0,5 M EDTA pH8,0 auf 5 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
SDS- Probenpuffer	2x	2,0 ml 1 M Tris pH 6,8, 3,0 ml 20 % SDS mit dH <sub>2</sub> O auf 20 ml auffüllen.
SDS- Probenpuffer	4x	500 µl 1 M Tris pH 6,8, 750 µl 20 % SDS, 4,0 ml 100 % Glycerin, 400 µl β- Mercaptoethanol, eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau, mit 3,5 ml dH <sub>2</sub> O auffüllen.
Spermidine	3,44M	49,9mg auf 100µl dH <sub>2</sub> O
Spermine	100mM	101mg auf 5ml dH <sub>2</sub> O
TBS-Puffer	10x	121 g Tris und 400 g NaCl mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 5 l auffüllen, lösen und den pH-Wert auf 7,6 mit konz. HCl einstellen.
TE Puffer+100 mM NaCl		950 µl TE Puffer und 50 µl 2 M NaCl
TE-Puffer	10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0	1 ml 1 M Tris pH 8,0, 200 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 100 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
Transfer-Puffer	10x	151,5 g Tris und 720 g Glycin mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 5 l auffüllen.
Transfer-Puffer	1x pH 8,3	100 ml 10 x Transfer-Puffer und 900 ml bidest. H <sub>2</sub> O mischen und pH-Wert einstellen.
Tris	1M, pH 8,0; 7,6; 7,4 bzw. pH 6,8	10,11g auf 100ml dH <sub>2</sub> O
Tris	1,5 M pH 8,8	90,86 g Tris auf 500 ml dH <sub>2</sub> O

## Verwendete Puffer

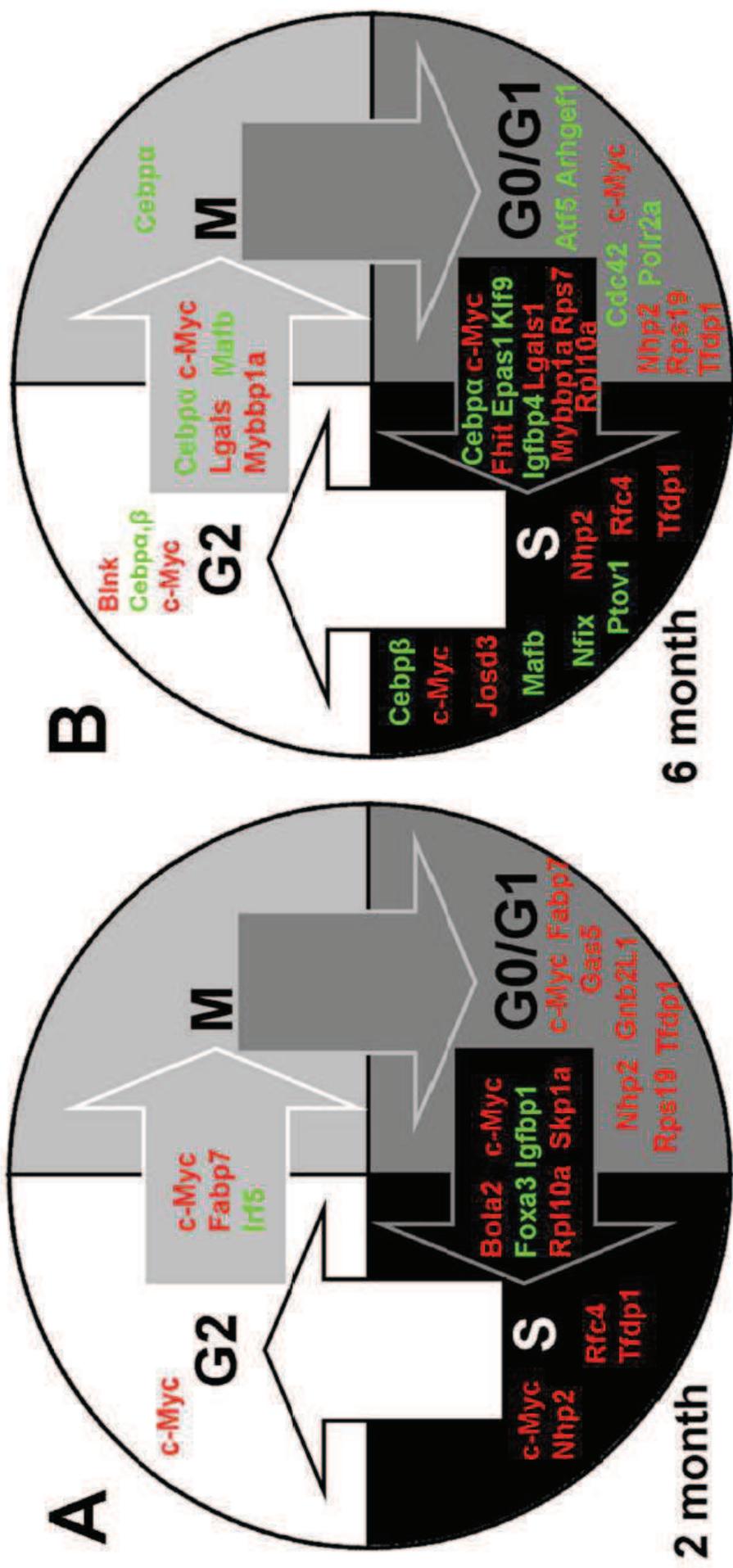
Verdünnungspuffer (DP)		125 $\mu$ l 1 M HEPES pH 7,6, 1 $\mu$ l 0,5 M EDTA pH 8,0, 200 $\mu$ l 1 M KCL, 570 $\mu$ l 100 % Glycerin mit 4104 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O auffüllen. Frisch 1 $\mu$ l 1 M DTT auf 1 ml Verdünnungspuffer zugeben.
Waschpuffer	1 x TBS + 0,1 % Tween 20	1 ml Tween 20 auf 1 l 1 x TBS-Puffer geben

Tabelle zu Transkriptionsraten

Gen	mRNA half-life average [h]	transcription rate (vsr) average [molecules/(cell*h)]	mRNA copy number average [molecules/cell]	Protein half-life average [h]	translation rate constant (ksp) average [molecules/(mRNA*h)]	Protein copy number average [molecules/cell]
Bcap29	10,03	0,93	10,39	53,28	142,37	40730,52
Dynll1	36,18	1,42	33,65	49,78	1094,01	982456,24
Rfc4	7,93	1,86	17,34	47,31	593,16	271450,76
Rexo2	14,66	2,33	34,07	45,7	213,48	188851,93
Col5a2	31,21	2,53	57,1	3,55	12,77	3321,51
Skpl1a	12,75	4,21	55,74	35,54	705,65	918066,77
Rps7	15,69	4,51	68,8	146,2	4765,08	11644436,86
Bzw2	12	5	63,55	55,12	304,7	539078,9
Tfdp1	6,16	10,13	76,71	6,94	15,7	9876,72
Rpl13a	16	23,74	366,95	168,05	406,32	5410761,04

(aus der genomweiten Analyse von MCF7-Zellen von Schwanhäuser 2011)

Abbildung mit allen signifikant regulierten Genen die den Zellzyklus betreffen für zwei und sechs Monate alte Aat-Myc transgene Mäuse



## Alle signifikanten Genlisten

### Signifikante Genliste der 3'UT Arrays

2Monate	6Monate	12Monate
1110017C15Rik	1110006I15Rik	0610039N19Rik
1110019J04Rik	1110019J04Rik	0610041E09Rik
1110025L05Rik	2610019E17Rik	1100001G20Rik
1110032N12Rik	2610511O17Rik	1110017C15Rik
2210023G05Rik	3110001N18Rik	1110025L05Rik
2410004N09Rik	4930553M18Rik	1110033J19Rik
2610019E17Rik	5730408K05Rik	1700048E23Rik
2610312E17Rik	Actn1	1700065A05Rik
3110001N18Rik	Ang1	1810014L12Rik
4632419I22Rik	Anpep	1810044O22Rik
4930553M18Rik	Apcs	2010002H18Rik
5730436H21Rik	Aqp4	2300006M17Rik
A230072I16Rik	Arhgef1	2310007H09Rik
Acad9	Atf5	2510015F01Rik
Ang1	Avpr1a	2600017J23Rik
Ap1s1	AW548124	2610019E17Rik
Aqp4	Bcat2	2610312E17Rik
Atp4a	Blnk	2610511O17Rik
Aurka	Bteb1	3110001N18Rik
Btbd4	Bxdc1	3110006P09Rik
Bzw2	Cdc42ep4	3732413I11Rik
Cct5	Cebpa	4833420K19Rik
Comtd1	Cebpb	4930553M18Rik
Csda	Col5a2	5730408K05Rik
Ctps	Comtd1	9430080K19Rik
D13Wsu177e	Cpox	9630050M13Rik
D17H6S56E-5	Ctps	A730008H23
Dnclcl	D030029J20Rik	Aadac
Fabp5	D12Ert647e	Aass
Foxa3	D13Wsu177e	Abcc2
Galk1	D19Wsu12e	Abcg2
Gnat1	Dm15	Abhd5
Gnb2-rs1	Dnajb9	Acp5
Gsn	Eif4ebp2	Acsl4
Igfbp1	Enpep	Acy3
Irf5	Epas1	Adecy4
Lamr1	Fhit	Adecy6
Lifr	Fhl1	Admr
Lpin1	Gjb2	Afm
Mmp12	Hist1h2ab	Agt
Mybbp1a	Igfbp4	Agxt
Myc	Igk-V8	AI316787
Nol5a	Il13ra1	Ak3
Nola2	Ipo4	Akp2
Nudcd2	Jup	Akr1b7
Orm3	Lgals1	Akr1b8
Ppan	Lpin1	Aldob
Ptgds	Lpl	Amd2
Rfc4	Mafb	Anxa2
Rnu22	Mki67ip	Aox1
Rpl10a	Mmp12	Apoa4
Rpl13a	Mrpl30	Apoa5
Rps19	Mybbp1a	Apoc2
Sdc1	Myc	Apof
Sdsl	Nfix	Apom
Serpina3k	Nme1	Aqp1

## Alle signifikanten Genlisten

Sh2bp1	Nol5a	Aqp8
Smfn	Nola1	Arbp
Socs2	Nola2	Arfgef1
Stmn1	Npm1	Arg1
Sult5a1	Nr1d1	Arih2
Tfdp1	Nrp1	Arl2bp
Tpp2	Nudcd2	Asl
Vnn1	Pabpc4	Atp5k-ps1
	Pck1	Atp6v1c1
	Pex6	Avpr1a
	Pltp	AW742319
	Polr2a	Axin2
	Ppap2b	Azgp1
	Ptov1	Baat
	Rab5b	Banf1
	Rfc4	Bax
	Rn18s	BC002199
	Rnu22	Bcap29
	Rpl10a	Becn1
	Rpl13a	Bglap1
	Rps19	Bglap-rs1
	Sash1	Bgn
	Sh2bp1	Bhmt
	Slc26a1	Blnk
	Snrk	Bmp1
	Socs2	Bok
	Sult5a1	Btg1
	Tenc1	Btg3
	Tfdp1	Bzw2
	Wbp2	C230093N12Rik
		C4
		C80913
		C9
		Calml4
		Car2
		Car3
		Car4
		Car5a
		Ccnb2
		Cct3
		Cct7
		Cd1d1
		Cd1d2
		Cd2ap
		Cd59a
		Cd59b
		Cd9
		Cdc20
		Cdc2a
		Cdc34
		Cdca3
		Ceacam1
		Cebpa
		Ces3
		Cfh
		Cfh1
		Chek1
		Cib2

## Alle signifikanten Genlisten

	Clec4f
	Cln6
	Col15a1
	Comtd1
	Cox6c
	Cpe
	Cryl1
	Cs
	Csad
	Csda
	Csrp2
	Cstb
	Cte1
	Ctps
	Ctps2
	Ctsc
	Cxcl12
	Cyp17a1
	Cyp2a12
	Cyp2b10
	Cyp2b13
	Cyp2b9
	Cyp2c37
	Cyp2f2
	Cyp3a13
	Cyp3a16
	Cyp4a14
	Cyp4b1
	Cyp4f13
	D15Erd785e
	D17H6S56E-5
	D19Wsu12e
	D3Erd194e
	D6Erd253e
	D6Wsu116e
	Daf2
	Dclrela
	Dcn
	Dct
	Ddit4
	Def8
	Dhrs3
	Dio1
	Dnchc1
	Dnclc1
	Dpp7
	Drg1
	Dsg2
	Dsp
	Dusp1
	Ect2
	Eef1d
	Eif1a
	Eif3s6
	Eif4b
	Emp3
	Eng
	Ephb4

## Alle signifikanten Genlisten

	Ephx1
	Erv4
	Es1
	Etf1
	Ethe1
	Ets2
	F10
	F7
	F8
	Fbln1
	Fbp1
	Fbxl22
	Fbxo21
	Fcgr2b
	Fcna
	Fgf1
	Fgfr2
	Fkbp11
	Fkbp7
	Fmo3
	Fxyd1
	Fytd1
	Fzd8
	Galk1
	Galt
	Gars
	Gas1
	Gas2
	Gas6
	Gbif
	Gclm
	Ghr
	Gimap4
	Gjb2
	Gldc
	Glul
	Gm2a
	Gnb2-rs1
	Gnl3
	Gnmt
	Gpd2
	Gpr125
	Gpr172b
	Gprk5
	Gpx2
	Gpx3
	Grina
	Gstm2
	Gstm3
	Gstp1
	Gtf2b
	Gtf2i
	Gtl2
	Gyg1
	H19
	H2-Ab1
	H2afx
	H2-D1

## Alle signifikanten Genlisten

	H2-DMa
	H2-Eb1
	H2-K1
	H2-Q1
	H2-Q2
	H2-Q7
	H2-Q8
	H2-T17
	Hal
	Hamp2
	Hes6
	Hgfac
	Hist1h2ab
	Hrsp12
	Hsd11b1
	Hsd17b2
	Hsd17b7
	Hsd3b1
	Hspca
	Htatip2
	Iap
	Iap11-1
	Iars
	Id2
	Id3
	Idh3a
	Ier3
	Ier5
	Ifit3
	Ifitm3
	Igf1
	Igf2r
	Igfals
	Igfbp5
	Igh-6
	Igk-V8
	Ii
	Ikbkg
	Il11ra2
	Il13ra1
	Il1r1
	Il6st
	Impdh2
	Inmt
	Invs
	Irf7
	Isyna1
	Itih1
	Itih4
	Jun
	Kctd17
	Kif22
	Klhdc2
	Krt2-8
	Lamr1
	Lars
	Lcat
	Lect2

## Alle signifikanten Genlisten

		Leprot
		Lgtn
		Lhx6
		Lip1
		Lmo2
		LOC280487
		LOC56628
		Lpl
		Ltbp4
		Ly6a
		Ly6d
		Mad211
		Mafg
		Maoa
		Masp1
		Masp2
		Mat2a
		Max
		Mcm4
		Mdfic
		Mgea5
		Mki67ip
		Mlp
		Mogat2
		Mpp1
		Mrps18a
		Mug1
		Mug2
		Mug-ps1
		Mup1
		Mup2
		Mup3
		Mup4
		Mup5
		Mybbp1a
		Myc
		Myo5b
		Nab2
		Naca
		Nap111
		Ncl
		Ndrg1
		Ndrg2
		Ndr1
		Nek2
		Nek6
		Net1
		Nfib
		Nit2
		Nlk
		Nnmt
		Noc4
		Nol5
		Nol5a
		Nola1
		Nola2
		Npc1
		Npdc1

## Alle signifikanten Genlisten

	Npm1
	Nudcd2
	Nupr1
	Nusap1
	Ogt
	Orm1
	Orm3
	Otc
	Ovgp1
	Pabpc1
	Pawr
	Pbx3
	Pck1
	Pcp4l1
	Pde8a
	Pde9a
	Pdgfa
	Pdk4
	Pdzk1
	Peci
	Perp
	Pfkm
	Pigr
	Pipox
	Pkd2
	Pla2g6
	Plat
	Plekha1
	Plk4
	Plk-ps1
	Pmp22
	Pnliprp1
	Pnpla2
	Polr2d
	Polr2e
	Por
	Ppap2a
	Pparg
	Prlr
	Prodh2
	Pros1
	Prp19
	Prss8
	Psat1
	Psen2
	Psemb8
	Psemb9
	Psmc12
	Ptk9l
	Ptpn14
	Pxmp2
	Qdpr
	Rabggtb
	Rac2
	Rad51l1
	Raet1c
	Ramp2
	Rangap1

## Alle signifikanten Genlisten

	Rapgef4
	Rasgrp2
	Rbm17
	Reln
	Rhoc
	Rnase4
	Rnu22
	Rock2
	Rpa1
	Rpl10a
	Rpl13
	Rpl13a
	Rpl18
	Rpl26
	Rpl3
	Rpl36a
	Rpl7
	Rplp1
	Rps10
	Rps11
	Rps12
	Rps25
	Rps27a
	Rps5
	Rps6
	Rps7
	Rps8
	Rrs1
	S100a1
	S100a13
	Saa2
	Saa4
	Sardh
	Sars1
	Sc5d
	Scarb1
	Scd2
	Scotin
	Scye1
	Sdc1
	Sdc2
	Sdfr2
	Sdhb
	Selenbp1
	Semcap2
	Serpina12
	Serpina1a
	Serpina1b
	Serpina1d
	Serpina1e
	Serpina3c
	Serpina3m
	Serpinf1
	Serpinf2
	Serping1
	Sfrs7
	Sfxn1
	Sgce

## Alle signifikanten Genlisten

	Sgk
	Sh3d19
	Slc10a1
	Slc11a2
	Slc1a2
	Slc1a4
	Slc1a5
	Slc20a1
	Slc22a1
	Slc25a15
	Slc27a5
	Slc29a1
	Slc3a1
	Slc6a12
	Slc7a2
	Slpi
	Smfh
	Smpd2
	Snx10
	Socs3
	Sod3
	Sptlc2
	Sqrdl
	Srebf1
	St3gal5
	St6gal1
	Stmn1
	Strbp
	Sult1d1
	Sult2a2
	Sult3a1
	Tat
	Tbc1d15
	Tbpl1
	Tbx3
	Tcf4
	Tcf7
	Tdo2
	Tek
	Tgfbi
	Thumpd3
	Timd2
	Timm17a
	Timm8a
	Tkl
	Tmsb10
	Tnfrsf11b
	Tnfsf5ip1
	Tpd521l
	Tpm1
	Tpst1
	Traf4
	Trfr2
	Trib3
	Trim37
	Trp53
	Tspan7
	Ttc3

## Alle signifikanten Genlisten

		Ubc
		Uble1a
		Upf3b
		Usf1
		Usp18
		Utp14a
		Uvrag
		Vars2
		Vil1
		Wbp5
		Wdr6
		Xlr3b
		Zap70
		Zfp639
		Zzz3

## Alle signifikanten Genlisten

### Signifikante Genliste der Exonarrays Signifikante Genexpression

K_NTR	D_NTR	T_NTR
0610007P08Rik	0610009B22Rik	1110002N22Rik
0910001L09Rik	1110014N23Rik /// Tm7sf2	1110007L15Rik
1110008L16Rik	1110020P15Rik /// 4930481A15Rik	1110014N23Rik /// Tm7sf2
1110014N23Rik /// Tm7sf2	1110050P16Rik	1110020P15Rik /// 4930481A15Rik
1110031I02Rik	1700003O11Rik	1110031I02Rik
1700020C07Rik	1700008F21Rik /// Ccdc7	1700015E13Rik
1700040K01Rik	1700020C11Rik	1700016G14Rik
1700047I16Rik	1700043A12Rik	1700024B05Rik /// EG546250 /// 100041497
1700109G15Rik	1700047I16Rik	1700028K03Rik /// A830010M20Rik
1810048J11Rik	1700060L04Rik	1700052K11Rik
2010300C02Rik	1700081D17Rik	1700081D17Rik
2010321M09Rik /// 6330549D23Rik	1700085G17Rik	1700125G22Rik
2210011C24Rik	2010107E04Rik	1810031K17Rik
2210012G02Rik	2010203P06Rik	2010007H06Rik
2310047B19Rik	2310031A07Rik	2310005E17Rik
2310061C15Rik	2410004N09Rik	2610024G14Rik
2310075C17Rik /// 100039341	2410080I02Rik	2700038C09Rik
2410004N09Rik	2810022L02Rik	2810004N23Rik /// Setd6
2410152P15Rik	2810026P18Rik	2810026P18Rik
2610024G14Rik	2900079G21Rik	2900052N01Rik
2810004N23Rik /// Setd6	3100002L24Rik	382044 /// Es1
2810022L02Rik	3110005L21Rik	4430402I18Rik /// Ppapdc2
2810026P18Rik	3110057O12Rik	4833419G08Rik /// LOC100048148
2900052N01Rik	4430402I18Rik /// Ppapdc2	4921534A09Rik
3110002H16Rik	4430402I18Rik /// Ppapdc2	4930430D24Rik
3200002M19Rik /// EG628119	4833419G08Rik /// LOC100048148	4930520O04Rik
4430402I18Rik /// Ppapdc2	4833442J19Rik	4930543D07Rik
4833418A01Rik /// A930009G19Rik	4921523P09Rik	4933426K07Rik
4930408O21Rik /// Uqerc2	4921539E11Rik	4933435F18Rik
4930423D22Rik	4930543D07Rik	5033403H07Rik
4930449E18Rik	4930553M12Rik	5430417L22Rik
4930452N14Rik	4930579D09Rik	5730408K05Rik
4930458K08Rik	4931432P07Rik	5730455O13Rik
4930471C06Rik	4933407H18Rik	5730601F06Rik
4930573O16Rik	4933411G11Rik /// Spdyb	9430008C03Rik
4930579D09Rik	4933425M03Rik	9430020K01Rik
4931414P19Rik	5730408K05Rik	9630001P10Rik
5033404E19Rik	5730457N03Rik	9830001H06Rik
5730408K05Rik	5830428M24Rik	A130026P03Rik
5730455P16Rik	6720401G13Rik	A430085C19
5730601F06Rik	9030425E11Rik	A730091E23Rik
5830406C21Rik	9030612M13Rik	Aatf
6430537K16Rik	9330132A10Rik	Abcd4
8030423F21Rik	9430008C03Rik	Abce1
9330102E08Rik	9430020K01Rik	Abcf1
9330156P08Rik	9830001H06Rik	Abr
9430008C03Rik	9830144P21Rik	Acbd6
9430031J08Rik	A430085C19	Acly

## Alle signifikanten Genlisten

9530048J24Rik	Abce1	Acsl5
A330076C08Rik	Abcf1	Adam23
A430103D13Rik	Abhd11	Adam23
A630023P12Rik	Acacb	Adpgk
A930007I19Rik	Acer1	Adra1b
AA881470	Acsl5	Adrbk2
Aarsd1	Acvr1c	Adsl
Aatf	Ada	AF362573
Abcd4	Adcyap1r1	AI462493
Abce1	Adsl	AI847670
Abcf1	Adss	AI848218
Abcf2	Afap1	Akap1
Abhd11	AI462493	Akap6
Abhd14a	AI847670	Akna
Acacb	Airn /// Igf2r	Als2cr12
Acbd6	Alad	Apcdd1
Accn5	Aldh2	Apex1
Acsl5	Aldob	Aph1b /// Aph1c
Acvr1c	Alkbh8	Apob48r
Adat1	Anapc1	Aqp1
Adsl	Ankdd1b	Aqp8
AF362573	Ankrd2	Arf5
Ahdc1	Apcdd1	Arhgap4
AI462493	Apex1	Arl15
AI847670	Apex2	Ascc1
Aifm1	Aph1b /// Aph1c	Asrgl1
Akna	Aqp1	Atm
Alad	Aqp8	Atr
Alg8	Aqp9	AU040320
Alox12e	Arf5	Aven
Anapc1	Arl4c	B230118H07Rik
Angel2	Arntl2	B230312A22Rik
Ankdd1a	Ascc1	B930049G02Rik
Ankrd13d	Asrgl1	BC013529
Ankrd2	Atad3a	BC023814 /// Mrpl24
Ankrd27	Atg2a	BC030046
Ano2	Atm	BC050092
Apcs	Atp5g3	BC063263
Apex1	Atpgd1	Bdkrb2
Aqp1	Atr	Bgn
Aqp8	Aven	Bhmt2 /// Bhmt
Arhgap27	BC016548	Bms1
Arhgap4	BC023814 /// Mrpl24	Bpnt1
Arl15	BC029214	Bzw2
Ascc1	BC035044	C1qbp
Asrgl1	BC061194	C1rl
Astn2	BC063263	C87977 /// Oog1 /// OTTMUSG00000010324 /// ENSMUSG00000072907 /// OTTMUSG00000010009
Atad3a	BC064033	Cad
Atf2	Bcar1	Calcr1
Atg2b	Bckdk	Calm1 /// ENSMUSG00000072884
Atg2b	Bgn	Cbs
Atm	Bhlha9	Ccdc132
Atp5g3	Bhmt2 /// Bhmt	Ccdc84
Atpbd4	Birc6	Ccr7
Atpgd1	Bzw2	Cct6a
Atpif1	C1qbp	Cd97

## Alle signifikanten Genlisten

AU042671	C1rl	Cdkn2c
Aven	C230006B20	Cep68
B430203I24Rik	C78197	Clec14a
Bat4	Cad	Cops7a
Bbs5	Calm1 /// ENSMUSG00000072884	Cox10
BC023814 /// Mrpl24	Cct6a	Cpn1
BC030046	Cd82	Crebl2
BC037704	Cdk10	Crp
BC063263	Cdk5rap3	Ctdspl
Bcar1	Cdk6	Ctps
Bms1	Cdk9	Ctso
Bpnt1	Cebpz	Cuta
Braf	Cep68	Cyb561
Brcc3 /// Zscan12	Chst14	Cyp4b1
Brd7	Clec14a	D730003K21Rik
Bud13	Cnbp	Dab2
Bxdc2	Cops7a	Daf2 /// Cd55
Bzw2	Cox10	Dbi
C030029H02Rik	Crat	Dbndd1
C1qbp	Crp	Ddx19b
C330023M02Rik	Ctdspl	Ddx56
Cad	Ctsf	Dhx37
Calcr1	Cyp4f14	Dkc1
Calm1 /// ENSMUSG00000072884	D17Wsu104e	Dpm3
Car1	D230037D09Rik	Dtx1
Ccdc132	D2Wsu81e /// Endog	Dus11
Ccdc56	D630033O11Rik	Ebna1bp2
Ccdc90a	Ddb1	Ednra
Ccne2 /// Ints8	DDo	Eef1b2
Cepgl /// Pigb	Ddx56	Efcab4a
Cepgl /// Pigb	Dhodh	EG226604
Cct3	Dhps	EG383528
Cct6a	Dhx37	EG433125 /// EG382843 /// Rpl21
Cdk10	Dhx9	EG433481
Cdk5rap3	Dio3os	EG547166
Cdk6	Dip2c	EG639396 /// Nedd4
Cebpz	Dis3 /// Pibf1	EG665615
Cep68	Dkc1	EG667078
Chic2	Dll1	EG668603
Churc1	Dnajc13	EG668731
Clcn3	Dnase113	Eif2a
Clec4e	Dph3	Eif3a
Col9a2	Dsc1	Eif3b
Commd3	Dsg1c /// Dsg1b /// Dsg1a	Eif3f
Cops3	Dus11	Eif3g
Cops7a	Dus4l	Eif3l
Coq5	Dusp9	Eif4b
Cox10	Dync2h1	Elp3
Cox11	E030049G20Rik	Elp4
Cpeb2	Ebna1bp2	Emid2
Cpeb3	Ebpl	ENSMUSG00000058057 /// LOC554292 /// Mett17a1 /// Mett17a2 /// Higd1c
Cpsf31 /// Pusl1	Ecd	ENSMUSG00000066041
Cr11	Eef1a1	ENSMUSG00000073459
Crnn	Eef1b2	ENSMUSG00000073525 /// ENSMUSG00000073524
Crp	Eef1e1	Epb4.112
Csnk1d	EG383528	Epha2

## Alle signifikanten Genlisten

Ctps	EG433125 /// EG382843 /// Rpl21	Eprs
Cts3	EG547166	Ercc8
Ctsf	EG639396 /// Nedd4	Ets1
Ctsm	EG666491	Exoc31
Cuta	EG666677	Exosc5
Cxxc5	EG667078	Exosc7
Cyb5d2	EG668210	Fabp5
Cyp4b1	EG668339 /// 1700011M02Rik	Fam169a
Cyp4f14	Eif2a	Fam98a
D17Wsu104e	Eif2c1	Farsb /// Sgpp2
D2Wsu81e /// Endog	Eif3b	Fezf1
D630033O11Rik	Eif3g	Fgl2
D630045J12Rik	Eif3i	Fmo9
Dbi	Eif3l	Fn1
Dest2	Eif4b	Fndc1
Dcun1d5	Elk1	Frag1
Ddb1	Elp3	Ftsj3
Ddost	Eng	G0s2
Ddx1	Eno2	Gabbr2
Ddx49 /// Homer3	ENSMUSG00000052629	Galk1
Ddx56	ENSMUSG00000074462	Galm
Dfna5	ENSMUSG00000074739	Galns
Dhodh	ENSMUSG00000075496 /// Ppib	Gas5
Dhx15	Eprs	Gda
Dhx37	Etnk2	Gdi1
Dhx9	Exoc31	Gemin5
Dip2c	Exosc2	Gen1
Dis3	Exosc5	Gimap3 /// Gimap5
Dkc1	Exosc7	Gimap4
Dmrtb1	Eya3	Gimap9
Dnahc17	Fahd2a	Gnb2
Dnaja4 /// Wdr61	Fam120a	Gnb5
Dnajc11	Fam174b	Gpatch4
Dnajc13	Farsb /// Sgpp2	Gpc4
Dnase113	Fastk	Gpr108
Doxl2	Fat4	Gpr39 /// Lypd1
Dpfl	Fhit	Grk5
Dph3	Frag1	Grm7
Dpm3	Fras1	Grpel1
Dsg1a	Ftsj3	Gtf2h1
Dsg1b	Gabbr2	Guf1
Dsg1c	Gad2	Guk1
Dtwd2	Galk1	H2-T10 /// H2-T9 /// H2-T22 /// H2-T17
Dtymk	Galns	Haus1
Dus11	Gars	Haus2
Dus41	Gas5	Hes5
E530001F21Rik /// Crxos1	Gca	Hist1h3d /// Hist1h3e /// Hist1h3b /// Hist1h3i /// Hist1h3h /// Hist1h3f
Ebna1bp2	Gcn111	Hmcn1
Ebpl	Gemin5	Hnrnpab
Ecd	Gen1	Hnrnpd
Eef1a1	Gfm2	Hps6
Eef1b2	Gimap9	Hscb
Eef1e1	Gjb2 /// ENSMUSG00000075582	Hspa9
Efhc1	Gm447	Iars
EG209380 /// Gabrg1	Gm454 /// BC055004	Ifi2711
EG384954	Gm879	Ift88
EG433481	Gnb2	Igfbp7

## Alle signifikanten Genlisten

EG547166	Gnl3	Il13ra1
EG628893	Gpatch4	Ilf2 /// Snapin
EG639396 /// Nedd4	Gpihbp1	Imp3
EG665194	Gpr108	Inhba
EG665615	Gpr21	Inpp5a
EG667970	Grk5	Ipo4
EG668473	Grpel1	Ipo5
EG668603	Gstol	Ipo7
EG668731	Guf1	Irak1
Ehd3	Haus1	Irf5
Eif2a	Hes5	Isca1 /// AK157302
Eif2b1	Hnrnpab	Itgad
Eif3a	Hoxd11	Kat2a
Eif3b	Hp	Kcna1
Eif3f	Hps6	Kcns3
Eif3g	Hs3st3b1 /// Hs3st3a1	Kctd12
Eif3i	Hscb	Kdelc1 /// 1700029F09Rik
Eif3l	Hspa9	Kdelc2
Eif4b	Htt	Kdr
Eif4g3 /// 8030494B02Rik	Iars	Kif21b /// Rpl18
Eif5b	Ide	Lancl1
Elp2	Idh3b	Lars2
Elp3	Idh3g	Ldhd
Emid2	Igfbp7	Ldhd
Eng	Il13ra1	Leprel2
ENSMUSG00000059244	Ilf3	Lifr
ENSMUSG00000066041	Inhba	LOC100044874 /// H2-K1 /// EG630499 /// LOC676708 /// H2-D1
ENSMUSG00000074740	Inhbb	Lrrc14
ENSMUSG00000074989	Ino80d	Lrrc2
ENSMUSG00000075426	Inpp5a	Lym1
ENSMUSG00000075433	Ipo4	Lysmd2
Eprs	Ipo5	Mast1 /// Dnase2a
Ercc5	Ipo7	Mcf2
Etf1	Irak1	Mecr
Evc2	Itgad	Med12l
Exosc10	Ivns1abp	Mettl8
Exosc5	Kat2a	Mkx /// 2410129H14Rik
Exosc7	Kif21b /// Rpl18	Mlh1
Eya3	Krt26	Mmgt1
F2	L2hgdh	Mppe1 /// Gnal
F430201B04Rik	Lancl1	Mreg
Fabp5	Lars	Mrpl20
Fam178b	Ldhd	Mrpl38
Fam38b2	Leprel2	Mrpl9
Fam98a	Lgtn /// Rassf5	Msl3l2
Fancg	LOC100048247	Mtfmt
Farsb	Lpin2	Mtrr
Fastkd2	Lrtm2	Mus81
Fbxo6	Lym1	Mxd1
Fcho1	Lysmd2	Myc
Fchsd2 /// 1110034A24Rik	Mab21l1	Napsa
Fkbp3	Matr3	Ncl
Foxred1	Mbnl2	Nle1
Frag1	Mcf2	Nme1
Ftsj3	Mecr	Nms
Fundc2	Med12l	Nol6
G0s2	Mettl1a	Nomo1

## Alle signifikanten Genlisten

Gabbr2	Mettl8	Nop10
Galk1	Mirhg1	Nop16
Galns	Mkx /// 2410129H14Rik	Nop56
Gas5	Mmachc	Nos3
Gca	Mmrn1	Ntn3
Gcat	Mobk11a	Nucb2
Gdi2	Mrpl20	Nup155
Gemin5	Mrpl37	Nup210
Gfm2	Mrpl50	Olf1128 /// Olf1134 /// Olf1133
Ghrh	Mrpl9	Olf115 /// Olf112
Glp1 /// Fdx11 /// Raver1	Mrps14	Olf117
Gm996	Mrps35	Olf1214
Gnl2	Mrps5	Olf1437 /// Olf1436
Gnl3	Msl312	Olf291
Gpatch4	Mta1 /// LOC100047235	Olf330 /// Olf325 /// Olf331 /// Olf328
Gpihbp1	Mtap1a	Olf411
Gpr108	Mtrr	Olf736
Gpr12	Muc16	Olf984
Gpr172b	Myc	Onecut2
Gpr39	Mycbp2	Onecut2
Grin2b	Mycn	Onecut2
Grk6	Nanos2	Oog4
Grpel1	Nars	OTTMUSG00000010229
Gsto1	Ndufb11	OTTMUSG00000015520 /// Rpl27a /// EG432798 /// EG546052
Gtf2h1	Ndufb2	Paqr3
Gtlf3a	Ndufs1	Parp12
Guca1a	Ndufs2	Pcdha5 /// Pcdhac2 /// Pcdha4 /// Pcdha9 /// Pcdha3 /// Pcdha7 /// Pcdha8 /// Pcdha12 /// Pcdha10 /// Pcdha6 /// Pcdhac1 /// Pcdha1 /// Pcdhga10 /// Pcdhga5 /// Pcdhga3 /// Pcdhga12 /// Pcdhga7 /// Pcdhga8 /// Pcdhga9 /// Pcdhgb6 /// Pcdhgc3 /// Pcdhgc5 /// Pcdhga11 /// Pcdhgb2 /// Pcdhgb4 /// Pcdhgb5 /// Pcdhgb7 /// Pcdhgb8 /// Pcdhga1 /// Pcdhga2 /// Pcdhga6 /// Pcdhgc4 /// Pcdhga4 /// Pcdhgb1 /// Pcdha11 /// Pcdha2 /// 3222401L13Rik
Guf1	Ndufv2	Pglyrp2
H2afy	Necab3	Pgrmc1
Hars	Nespas	Pisd-ps1 /// 4933439C20Rik /// Pisd
Hbs11	Nfs1	Plekhb2
Hcn4	Nhlrc2	Plekhf2
Heatr5b	Nle1	Pltp /// Ctss
Hectd1	Nlrp9c /// Nlrp9a	Pnck
Helq	Nme1	Pnp1
Hnrnpab	Nol8	Poli
Hnrnpb2	Nol9	Polr1b
Hoxc13	Nop10	Ppil3 /// Nif311
Hp	Nop16	Pppde2 /// Xrcc6
Hspa4	Nop58	Ppy
Hspa9	Nos3	Prdm14
Htt	Npm1	Preb /// Abhd1
Iars	Nsun2	Prep
Iars2	Nudt5 /// OTTMUSG00000010878	Prmt3

## Alle signifikanten Genlisten

Ide	Nup155	Prmt5
Idh3b	Nup210	Psd2
Idh3g	Nup88	Psemb9
Ifi2711	Nvl	Psm11
lkbke	Nxn	Psmg2
Ilf2 /// Snapin	Odc1	Psmg4
Ilf3	Olf1701	Ptd3
Imp3	Olf1908	Ptgs1
Imp4	Olf1968	Ptn
Ints2	Onecut2	Ptpn4
Ints4	Onecut2	Pus1
Ipo13	Oog2 /// OTTMUSG00000010328	Pus3
Ipo4	OTTMUSG0000000504 /// LOC632900	Qars
Ipo5	OTTMUSG00000012426	Qsox1
Ipo7	OTTMUSG00000015520 /// Rpl27a /// EG432798 /// EG546052	Rai12
Iqsec3	Otx2os1	Rblc1
Irak1	P2rx3	Rbms3
Itga4	Paip2b	Rcc2
Itgad	Papln /// Paqr3	Rexo2
Itgb11	Parp3	Rhoj
Itih5	Pcca	Rom1
Ivns1abp	Pcdhb1	Rpl12
Jmy	Pcgf3 /// Rpl34 /// ENSMUSG00000060730	Rpl29 /// EG667338 /// 100041859 /// EG432721 /// 622707
Kars	Pctp	Rpl8
Kat2a	Pfas	Rpp38
Kcnn4	Pglyrp2	Rps6kb1
Kcns1	Pgrmc1	Rrp15
Kcns3	Pisd-ps1 /// 4933439C20Rik /// Pisd	Scd1
Kif21b	Plaa	Sdc1
Kifc2	Plac11	Sec11c
Klhdc2	Pltp /// Ctsa	Set /// BC085271
Klk1b21 /// Egfbp2 /// Klk1b26 /// Klk1b8	Pmpca	Sh2d1a
Kpnb1	Poli	Shb
L2hgdh	Polr1b	Skiv212 /// Ppap2a
Lama5	Ppat	Slc17a2
Lanc11	Ppig	Slc25a19
Lars2	Pppde2 /// Xrcc6	Slc25a36
Lca5 /// Rps27a	Prdm14	Slc26a3
Ldhd	Prdm6	Slc30a10
Limd1	Prep	Slc36a4
LOC100044874 /// H2-K1 /// EG630499 /// LOC676708 /// H2- D1	Prep	Slc43a1
LOC100045438	Prmt3	Slc44a2
LOC433762 /// LOC629446	Prmt5	Slc6a13
LOC497255	Psemb9	Slc9a7
LOC675812	Psmg2	Smad7
LOC73899	Ptd3	Smpd13b
Lrppre	Ptdss1	Smyd1
Lypd1	Pth1r	Snape4
Lym4	Ptk7	Snd1
Lym7	Ptpla	Snhg1
Mafk	Ptpn4	Snx8
Mast1 /// Dnase2a	Ptpn4	Sp25

## Alle signifikanten Genlisten

Mat2b	Ptprcap /// Rps6kb2	Spnb2
Matr3	Pus1	Srbd1
Mbd5	Pus3	Srgap3
Mbnl2	Pvt1	Ssfa2
Mbtps2 /// Yy2	Pyroxd2	Ssr4
Mcee	Qars	St7
Me1	Qser1	St8sia3
Me3	R3hdm1	Stab1
Mecr	Rab1b	Stim2
Med12l	Rab3d	Sult5a1
Memo1	Rabep2	Syt14
Mettl8	Rapgef1	Taf1d
Mical1	Rasgrp2	Taf4b
Mkx /// 2410129H14Rik	Rbm20	Taf6
Mlh1	Rem2	Tbc1d5
Mmachc	Rerg	Tb12
Mobkl1a	Rexo2	Tb13
Mov10l1	Rfwd2 /// CsdA	Tbrg4
Mrfap1	Rfx7	Tc2n
Mrpl16	Rhoa	Terf2
Mrpl20	Rhobtb3 /// Wdr77	Timm8b /// AU019823
Mrpl3	Rhoj	Tmed8
Mrpl37	Robo4	Tmem106b
Mrpl38	RP23-303F24.3	Tmem171
Mrpl50	Rpl12	Tmem18
Mrpl9	Rpl4	Tmem211
Mrps18c	Rpl5	Tmem47
Mrps2	Rpl8	Tmem59l
Mrps35	Rpp38	Tmem69
Mrps5	Rps6kb1	Tmem93
Mrs2	Rpsa /// ENSMUSG00000047676	Tnk2
Mta1 /// LOC100047235	Rras	Tom11l /// Cox11
Mtap1b	Rsrc2	Tomm5
Mtg1	S100a10	Trmu
Mto1	S100a6	Trnau1ap
Mtpap	S1pr3	Tspan14
Mtrr	Scap	Ttc13
Myc	Scd1	Ttc27
Mycbp2	Secisbp2	Ttc37 /// Itga4
N6amt2	Seh1l	Txlnb /// Cdyl
Nars	Serbp1	Ubp2
Nat10	Serpinf2	Ube2cbp
Nbas	Sf3b3	Ube2k
Ncan	Sfrp5	Ube2z
Ncl	Sfrs3	Ube4b
Ndufa12	Sfxn3	Vps13b
Ndufb11	Sgcg /// Sacs	Vps26b
Ndufb5	Sgsm1	Wdfy3
Ndufb6 /// 2010003O02Rik	Sh2b2	Wdr12
Ndufs2	Sh3tc2	Wdr36
Ndufv2	Shank3	Wdr36
Necab3	Siah1a /// Siah1b	Wdr43
Nedd8	Siglec15	Wdr48 /// Gorasp1
Neol	Skiv2l2 /// Ppap2a	Wdr55 /// Dnd1
Nes	Skp1a	Wwc2
Neur11a	Slc25a12	Xpo4
Nif3l1	Slc25a19	Zc3h11a
Nme1	Slc25a39	Zc3h12a

## Alle signifikanten Genlisten

Nol8	Slc35c2	Zc3h7b
Nomo1	Slc39a11	Zdhhc19
Nop10	Slc43a1	Zfp653
Nop14	Slco1a5 /// EG625716 /// Slco1a6 /// Slco1a4 /// Slco1a1	Zfp87 /// A530054K11Rik /// Zfp748
Nop16	Slco2a1	Znrf2
Nop56	Smpdl3b	
Nop58	Smyd1	
Nos3	Smyd2	
Npc1	Snape4	
Npepps	Snd1	
Nsun2	Snhg1	
Nt5c	Snhg10	
Nt5c3	Sox17	
Ntn5 /// Sec1	Spag1	
Nudt5 /// OTTMUSG00000010878		Spatc1 /// ENSMUSG00000075583
Nup133	Srbd1	
Nup155	Srgap3	
Nup210	Srgap3	
Nvl	Srp72	
Nxn	Srpkl	
Odc1	Ssr4	
Odc1	Ssu72	
Ogfr11	St7	
Olfr1226	Stard7	
Olfr1239	Stau2	
Olfr1245	Sult5a1	
Olfr1286	Sys1	
Olfr46 /// Olfr538 /// GA_x5J8B7TT63N-1148-873	Syt16	
Olfr520		Syt9 /// OTTMUSG00000023094
Olfr654	Sytl1	
Olfr657	Taf1d	
Olfr701	Tas2r131	
Olfr747	Tbl3	
Olfr749	Tbrg4	
Olfr968	Tcf3	
Onecut2	Tfb1m	
Onecut2	Thsd7a	
Onecut2	Timm9	
Onecut2	Tmc2	
OTTMUSG00000011028	Tmem131	
OTTMUSG00000011607	Tmem143	
OTTMUSG00000012426	Tmem151a	
OTTMUSG00000015520 /// Rpl27a /// EG432798 /// EG546052	Tmem176b	
OTTMUSG00000016925 /// Cask	Tmem211	
Otx2os1	Tmem63a	
Oxa11	Tmem69	
P4hb	Tnfrsf9	
Padi2	Tnk2	
Paip2	Tnpo3	
Paqr9	Tnrc6b	
Parp1	Tom111 /// Cox11	
Pcdh12	Tomm5	
Pcgf3 /// Rpl34 /// ENSMUSG00000060730	Tpbg	
Pctp	Tpp2	
Pdcd1	Traf4	

## Alle signifikanten Genlisten

Pdia3	Trav7d-2	
Pdia6	Trmu	
Pds5b	Trub1	
Pet112l	Tsc22d4	
Pfas	Tspan12	
Pgrmc1	Ttc13	
Phactr3	Ttc27	
Phf6	Ttc37 /// Itga4	
Pibf1	Txnl4a	
Pigf	Tyms	
Pigg	Ube2cbp	
Pigu	Ube2e1	
Pigv	Ube4a	
Pip4k2b	Ube4b	
Pkp3	Vat1	
Plekhm3	Vipr1	
Pltp /// Ctsa	Vps13a	
Pmpca	Vps13b	
Pnck	Vps13c	
Pnp1	Vps4b	
Pnpla3	Vps53	
Pnpla7	Wdr36	
Pogz	Wdr36	
Poli	Wdr40a	
Polr1b	Wdr43	
Pop7	Wdr48 /// Gorasp1	
Ppap2a	Wdr59	
Ppat	Wdr6	
Ppig	Wdr7	
Ppil3	Wdr72	
Pppde2	Wwc2	
Preb /// Abhd1	Xpnpep3	
Prep	Xpo4	
Prf1	Yars	
Prkd2	Zbtb8a	
Prmt3	Zdhhc16 /// Mms19	
Prmt5	Zdhhc18	
Prpf19	Zdhhc19	
Prpf39	Zfp106	
Prrt3	Zfp110 /// Zfp369	
Psmb9	Zfp609	
Psmg2	Zfp661	
Pted1 /// Bud31	Zmyml	
Pted3		
Ptch1		
Ptges2		
Ptk7		
Ptpla		
Ptpn4		
Ptprs		
Pus1		
Pus3		
Pus7		
Pusl1		
Pygb		
Pyroxd2		
Qars		
Qser1		

## Alle signifikanten Genlisten

R3hdm1		
Rabep2		
Ranbp3l		
Rapgef1		
Rars		
Rblcc1		
Rbm45		
Rcc2		
Rem2		
Rexo2		
Rfx2		
Rfx7		
Rhobtb3		
Rhog		
Rims4		
Rnf214		
Rnpep		
Robo4		
Rpl12		
Rpl18		
Rpl4		
Rpl8		
Rpp40		
Rprd1a		
Rps23 /// LOC100048204 /// EG667423 /// ENSMUSG00000058932 /// EG381438 /// EG667414		
Rps6kb1		
Rrp15		
Rsf1		
Ruvbl1		
Ryk		
S100a8		
Sacs		
Scand3 /// Chchd2		
Scara3		
Scd1		
Schip1		
Sec11c		
Sec61a1		
Secisbp2		
Seh1l		
Senp8		
Serbp1		
Serpinf1		
Serpinf2		
Set /// BC085271		
Sf3b3		
Sgcg		
Sgpp2		
Sgsm1		
Sh2b2		
Sh3d19		
Sh3rf3		
Siglec15		
Skiv2l2		
Slc16a14		
Slc1a1		
Slc23a1		
Slc25a12		

## Alle signifikanten Genlisten

Slc25a39		
Slc25a40		
Slc28a3		
Slc35c2		
Slc35f2		
Slc39a11		
Slc43a1		
Slc47a1		
Slc6a20b /// Slc6a20a		
Smarcc1 /// ENSMUSG00000074056		
Smchd1		
Smpd13b		
Smyd1		
Smyd2		
Snd1		
Snhg1		
Snx11		
Snx22 /// Ppib		
Snx5		
Sox11		
Sox13		
Sox17		
Sox18		
Sp8		
Sp9		
Spatc1 /// ENSMUSG00000075583		
Spnb5		
Spry2		
Srgap3		
Srp72		
Srpk1		
Ssr2		
Ssr4		
Ssu72		
St6galnac1		
Stra13		
Stt3a		
Sult5a1		
Sympk		
Syt16		
Syt11		
Taf1d		
Tarsl2		
Tbc1d14		
Tbc1d5		
Tbl2		
Tbl3		
Tbrg4		
Tc2n		
Tceb1		
Tcerg1		
Tfb1m		
Thada		
Thsd7b		
Thyn1 /// Vps26b		
Timm17a		
Tmbim1		
Tmcc2		

## Alle signifikanten Genlisten

Tmed8		
Tmem131		
Tmem143		
Tmem151a		
Tmem167		
Tmem176b		
Tmem204		
Tmem60		
Tmem69		
Tmem81		
Tmem93		
Tnk2		
Tnpo3		
Tnrc6b		
Tnrc6b		
Tom111		
Tomm5		
Tpp2		
Trmu		
Trub1		
Tsc1		
Tsc22d4		
Tsga14		
Ttc13		
Ttc27		
Ttc37		
Txn14a		
Uba3		
Uba52 /// Hexim1 /// OTTMUSG00000004411 /// EG383341 /// 2810422J05Rik		
Uba52 /// OTTMUSG00000004411 /// EG665964 /// 2810422J05Rik		
Ube2cbp		
Ube2z		
Ube4a		
Ube4b		
Ubn2		
Ubr1		
Uck1		
Ugcgl1		
Ugcgl2		
Usp13		
Usp39		
Usp8		
Utp6		
V1rd3 /// V1rd10		
V1re4		
Vash1		
Vat1		
Vps13a		
Vps13b		
Vps13c		
Vps33a		
Vps53		
Vsig8		
Wdfy3		
Wdfy3		
Wdr12		
Wdr36		
Wdr36		

## Alle signifikanten Genlisten

Wdr40a		
Wdr43		
Wdr59		
Wdr74		
Wdr77		
Wfdc15b		
Xpnpep3		
Xpo4		
Xrcc6		
Yars		
Zbtb48		
Zbtb8a		
Zc3h15		
Zcchc17		
Zcchc8		
Zdhhc16 /// Mms19		
Zfhx4		
Zfp106		
Zfp110		
Zfp366		
Zfp369		
Zfp451		
Zfp617		

## Alle signifikanten Genlisten

### Signifikante Genliste der Exonarrays Signifikanter Exongebrauch

E_K_Ntr	E_D_NTR	E_T_NTR
0610008C08Rik	0610009O20Rik	0610037L13Rik
0610038D11Rik	1600012F09Rik	0610038D11Rik
1110032A03Rik	1700034H14Rik	1700034H14Rik
1110039B18Rik	1810013C15Rik	1810013C15Rik
1810013C15Rik	2010315L10Rik	2210023G05Rik
2310003F16Rik	2210023G05Rik	2310067B10Rik
2310033P09Rik	2310045A20Rik	2410018G20Rik
2310045A20Rik	2410003P15Rik	2410091C18Rik
2310067B10Rik	2410018C20Rik	2610529C04Rik
2410091C18Rik	2410127E18Rik	2810007J24Rik
2610301G19Rik	2610024G14Rik	2810046L04Rik
2610304G08Rik	3110043O21Rik	4632417N05Rik
2610529C04Rik	4631426J05Rik	4931406I20Rik
2810007J24Rik	5730409G15Rik	4931406P16Rik
2810405K02Rik	6030496E16Rik	4933434E20Rik
4632417N05Rik	8430419L09Rik	5730446C15Rik
4833420G17Rik	Aatf	5730494N06Rik
4931406P16Rik	Abca8a	5730596K20Rik
4932442K08Rik	Abce1	6330407G11Rik
4933407N01Rik	Abcf2	6530401N04Rik
5730494N06Rik	Acacb	9130404D08Rik
6430706D22Rik	Acbd4	A730098D12Rik
9030612M13Rik	Acss2	Abca1
9130401M01Rik	Adamts1	Abcf3
A730055C05Rik	Adipor2	Abcg2
Abca1	Adss	Abcg8
Abca8a	Agpat5	Abi1
Abcc2	Agxt2l2	Acacb
Abcg2	AI462493	Acat3
Abcg8	AI847670	Aco1
Abhd6	Alad	Acox2
Acaal1a	Aldh9a1	Acsl3
Acacb	Alg8	Adam9
Acad10	Anapc1	Aes
Aco1	Ap1gbp1	Aff4
Acox2	Aph1a	Afmid
Acsl3	Aprt	Agxt2l1
Actl6a	Aqp8	Ahsa1
Actr2	Arbp	AI182371
Adam9	Ard1	AI314976
Adfp	Ascc2	Akr1c19
Ahr	Atad3a	Akr1c20
AI314976	Atic	Alg11
Akr1c14	Atm	Anapc5
Aldh16a1	Atp13a1	Angptl3
Alg11	Atp5f1	Anp32b
Anapc5	Atp5g1	Apoa1
Ang1	Atp5g2	Apoc1
Ank3	AU040320	Ar
Anks1	AU042671	Araf
Ap3d1	Auh	Arbp
Apoa1	AW548124	Arfgap3
Araf	B4galt5	Arhgap26
Arbp	BC021395	Arhgap29
Arfgap3	BC024814	Arid1a
Arhgap26	BC029214	Armxc3

## Alle signifikanten Genlisten

Arhgap29	Bcar1	Ascc3l1
Arhgef18	Bckdk	Asrgl1
Arhgef7	Bcl7a	Atf5
Arid1a	Bcs1l	Atp1b3
Arih1	Bhmt	Atp2a2
Ars2	Bop1	Atp5a1
Ascc3l1	Bri3bp	Atp5g2
Aspscr1	Bzw2	Atp6ap1
Atad3a	C1qbp	Atp6v0a2
Atg9a	C330023M02Rik	Atp6v0e
Atp5a1	Cad	Atp8b1
Atp5g1	Ccdc28a	AU018778
Atp6ap1	Ccnd3	B230219D22Rik
Atp6v0e	Ccne1	Bap1
Atp6v1d	Cct2	BC021395
Atp6v1e1	Cct3	BC031853
Atp8b1	Cct5	BC033915
Atrnl1	Cd164	Bcap3l
Atrx	Cdk4	Bcl7b
AU018778	Cdk5	Bcs1l
B230219D22Rik	Cdk5rap3	Birc6
Bap1	Cdk6	Bsg
BC004044	Cdk7	Btbd1
BC015286	Cebpz	Btg1
BC031853	Chchd5	C230093N12Rik
BC033915	Chd1l	C430048L16Rik
Bcap3l	Chid1	C4a
Bcl7b	Cirh1a	C9
Bin1	Clec4g	Cad
Bsg	Clpp	Camk1d
Btbd1	Cnot1	Canx
Cab39l	Cops7a	Capza2
Cacna1c	Cox10	Ccar1
Cad	Cox7a2l	Cct3
Camk1d	Cpeb2	Cd55
Canx	Cpne8	Cdk7
Car5a	Crat	Cds2
Ccb1l	Ctdspl	Cfdp1
Ccdc56	Ctsf	Ciapin1
Ccnc	Cxxc1	Clec4f
Cct3	Cyp4f14	Cmb1
Cd55	D12Ertd647e	Col14a1
Cdk5	D130059P03Rik	Col27a1
Cdk5rap3	D2Wsu81e	Cp
Cds2	Dbt	Ctnnb1
Clasp2	Ddb1	Cyp2c29
Clptm1	Ddo	Cyp2d13
Cltc	Ddx21	Cyp2d9
Cmb1	Ddx39	Cyp4a12b
Cnksr3	Dhcr7	Cyp4f13
Cnot7	Dis3	D10Wsu102e
Col4a1	Dnaje1	D19Bwg1357e
Copg	Dnaje11	D19Ertd386e
Coq9	Dnase1l3	Dbt
Cox7b	Dph5	Dclre1a
Cp	Dscr2	Ddb1
Cpb2	Dsg1b	Ddx17
Cpeb4	Dsg1c	Ddx58

## Alle signifikanten Genlisten

Creb3l2	Dus1l	Dgcr8
Csde1	Dusp6	Dhdds
Csnk2b	Ebna1bp2	Dhrs7
Ctnnb1	Ebp	Diap2
Cyp2d22	Ecd	Dnaja1
Cyp2d9	Echdc2	Dtd1
Cyp2j9	Ecm1	Dync1h1
Cyp4a12b	Edd1	Dyrk1a
D12Ertd647e	Eef1b2	Ebna1bp2
D14Ertd449e	Eef1e1	Ecgf1
Dars	Eef1g	Edem1
Dbt	Eef2	Eef1b2
Dclre1a	EG620782	Eef2
Ddb1	EG625285	EG214321
Ddx17	EG628438	EG627342
Ddx24	EG630138	EG628577
Ddx54	EG667618	EG630138
Ddx58	EG668117	Egfr
Dgat2	EG668668	Ehmt2
Dgcr8	Ehd3	Ei24
Dgkd	Eif2a	Eif2b4
Dhps	Eif2s1	Eif3s12
Dhx30	Eif3s12	Eif3s6
Dhx35	Eif3s2	Eif3s8
Diap2	Eif3s6	Eif4a3
Dirc2	Eif3s6ip	Enpep
Dnm1l	Eif3s9	Entpd4
Dnttip1	Eif4a1	Es22
Dnttip2	Eif4ebp1	Etfa
Dock8	Eif5a	Etfb
Dpy19l1	Elac2	Eva1
Dtd1	Elk3	F12
E430025E21Rik	Elov16	Farsb
Ebna1bp2	Elp3	Fbxw8
Ebp	Eng	Fgb
Ebpl	Erh	Flii
Edg1	Exosc2	Frrs1
Eef1b2	Exosc7	Ftl1
Eef2	Farsa	Ftsj3
Eftud2	Farsb	G3bp2
EG214321	Fastk	Galt
EG627342	Fastkd1	Ganab
EG628577	Fcgr2b	Gas5
EG630138	Fcmd	Gckr
EG668117	Fdps	Gclc
EG668668	Fhit	Gcn5l2
Egfr	Frrs1	Gda
Ehmt2	Ftsj3	Gltscr2
Ei24	Fubp1	Gnas
Eif2ak3	Ga17	Gphn
Eif3s12	Galk1	Gpil
Eif3s7	Gart	Gsr
Elp4	Gas5	H1f0
Eml4	Gata4	Hemk1
Enpep	Gca	Hgfac
Entpd4	Gcn1l1	Hgsnat
Epas1	Gcn5l2	Hlf
Ephx1	Gdi1	Hpxn

## Alle signifikanten Genlisten

Eps15l1	Gemin5	Hsd11b1
Erc3	Gfm2	Hsp90b1
Exoc4	Gimap4	Hspa8
Exod1	Glt25d1	Hyou1
Fah	Gm1818	Il15ra
Farsb	Gm2a	Il1rap
Fasn	Gnb2l1	Ireb2
Fastkd5	Gne	Irf6
Fbxw8	Gnl3	Itch
Fcna	Gorasp1	Itgb1
Fgb	Gpd1l	Itm2c
Fnta	Gpr110	Itpa
Foxj3	Gpr175	Kif21a
Frrs1	Gpr89	Klf3
Ftsj3	Gpr98	Klkb1
Galnt1	Grsf1	Kpnb1
Galt	Gsto1	Kynu
Ganab	Gstt1	Laptm4a
Garnl1	H2-Q2	Lass2
Gas5	H2-Q8	Ldb1
Gata6	Haao	Letm1
Gcs1	Hdac10	Lin7c
Gda	Hdh	Lmbr1
Gins4	Hnrpab	Lmbrd1
Gltscr2	Hp	LOC230639
Gmfb	Hps4	LOC546832
Gnas	Hrsp12	Lpin2
Gnb1	Hsd17b2	Lrprrc
Gnb2l1	Huwe1	Luc7l2
Gpbp1	Iars	Lypla2
Gphn	Ide	Lyzs
Gpi1	Idh1	Magi3
Gps1	Idh3b	Man1a2
Gramd3	Idh3g	Man2a2
Grb7	Igbp1	Mapkap1
Grtp1	Igf2r	March6
Gtf3a	Ikbke	Med25
Gtpbp4	Il13ra1	Mfn1
Gypc	Ilf2	Mier1
Hac1l	Immt	Mif
Hars	Impdh2	Mknk1
Hdac1	Ipo4	Mlx
Hdh	Irf5	Mme
Herc4	Ivns1abp	Mospd1
Hexa	Jmy	Mrc1
Hexim1	Josd3	Mrpl39
Hgd	Kdelc1	Mtg1
Hsd17b4	L2hgdh	Mttp
Hsp90aa1	Lanc1l	Mus81
Hsp90b1	Lars2	Mybbp1a
Hspa8	Lbr	Myo6
Huwe1	Lcmt1	Nbr1
Hyou1	Ldhd	Ncaph2
Idh2	Lgtn	Ncoa1
Ift172	Limd1	Ncoa4
Igfbp4	LOC665010	Ncoa6
Ikbke	LOC669952	Ncor2
Il15ra	LOC671887	Ndst1

## Alle signifikanten Genlisten

Il18bp	Lpl	Ndufb8
Il1rap	Ltbp4	Nmt1
Impdh2	Lyar	Nod1
Ing4	Man2a2	Nol5
Insig1	Mbnl2	Npepl1
Ipo11	Mbtps2	Nsdhl
Irgm	Mcee	Nub1
Isy1	Mcts1	Nubp2
Itch	Mecr	Nudc-ps1
Itpr2	Mettl8	Nup188
Jtv1	Mina	Nxt2
Kcnn2	Mir16	Opa1
Kif3b	Mki67ip	Otud6b
Klf3	Mknk2	Pabpc1
Klkb1	Mlh1	Papss2
Krtcap2	Mmachc	Pctk3
Lass2	Mod1	Pcyox1
Letm1	Mrpl19	Pcyt2
Lims2	Mrpl21	Pgcp
Lman2l	Mrpl3	Phf14
LOC230639	Mrpl37	Phgdhl1
LOC671077	Mrpl45	Phldb2
LOC672299	Mrpl50	Picalm
Lrpprc	Mrpl53	Pigp
Lypla2	Mrpl9	Pik3r4
Lypla3	Mrps10	Pisd
Magi3	Mrps2	Pitpnb
Mapkap1	Mrps30	Pkm2
Med25	Mrps35	Pkn2
Mif	Mrps5	Pkp4
Mknk1	Mrto4	Plec1
Mkrn2	Mtg1	Plekha6
Mlx	Mto1	Pltp
Mod1	Mybbp1a	Pnkd
Morc2a	Myg1	Pnpla7
Morf4l1	Myh14	Polr3a
Mpp5	Myohd1	Ppan
Mrpl11	Nadsyn1	Ppfibp1
Mrpl4	Ncl	Ppm1k
Mrps23	Ndr3	Ppp2ca
Mrps30	Ndufb11	Prki
Mtmr4	Ndufb5	Prkrir
Mus81	Ndufs2	Psma4
Myo9b	Nedd4	Psmd12
Nags	Nfs1	Psmd7
Ncoa1	Nhlrc2	Pten
Ncoa2	Nhp211	Ptplad1
Ncoa6	Nhp211	Pvr13
Nedd4l	Noc4l	Pygl
Nfia	Nol1	Qk
Nfyb	Nol5	Rab6
Nhp211	Nol5a	Rad54l2
Nmt2	Nol9	Ranbp5
Nobl	Nola3	Rars
Npc1	Npm1	Rbbp4
Npc2	Npr1	Rbl2
Nt5dc1	Nsun2	Rbm28
Nubp2	Nt5dc2	Rbm39

## Alle signifikanten Genlisten

Nudt7	Nudc-ps1	Rcc2
Nup188	Nudt5	Rcl1
Nxt2	Nup133	Rdh9
Opa1	Nup155	Reln
Orc3l	Nup210	Rhbdd1
ORF61	Nutf2	Rhot1
Otc	Nvl	Rnu32
P4ha1	Ogdh	Rod1
P4hb	OTTMUSG00000016327	Rpl10a
Papss2	Otud6b	Rpl12
Pcca	Pa2g4	Rpl14
Pcgf6	Pabpc1	Rps19bp1
Pctk3	Pabpc4	Rps3
Pdcd5	Pcdha7	Rps7
Pdha1	Pcgf3	Rrp1
Pdia3	Pctp	Rtn3
Pdxk	Pde1a	Saal1
Pfkm	Pdia6	Saps3
Pgcp	Pes1	Sat1
Phactr4	Pfkl	Sc5d
Phf14	Pgam1	Scamp3
Phgdhl1	Phb	Scd1
Phlda1	Phr1	Scd2
Picalm	Pik4ca	Scpep1
Pja1	Pisd	Sec14l2
Pkm2	Pklr	Sec24a
Pla1a	Plcb1	Sel1l
Plec1	Plec1	Sep15
Plxnb2	Pltp	Serpinc1
Pnpla7	Pmm2	Sf3b3
Pnpo	Pmpca	Sil1
Polr3a	Pmvk	Slc17a3
Pomt1	Poldip2	Slc17a5
Pomt2	Polg2	Slc23a2
Ppan	Poli	Slc25a10
Ppfibp1	Polr2e	Slc39a7
Ppp2r1a	Polr3b	Slc44a1
Prkca	Ppap2b	Slco2a1
Psmd12	Ppat	Smad3
Psmd2	Ppif	Smc4
Psmd7	pPtp4a3	Snag1
Ptplad1	Prelp	Snx9
Ptpmt1	Prep	Spes1
Ptpn21	Prkcz	Spen
Ptprcap	Prmt3	Spg20
Pxmp2	Prmt5	Spnb2
Pzp	Prmt7	Sqrdl
Qk	Prss8	Srm
R3hdm1	Ptcd1	Srpk2
Rab14	Ptcd3	Srpr
Rab6ip1	Ptpn4	St6gal1
Rabggtb	Pus1	Suhw4
Rad23b	Pus3	Supt16h
Ranbp5	Pycl1	Taldo1
Rangap1	Qars	Tdo2
Rars	Qdpr	Tegt
Rbbp4	R3hdm1	Thoc1
Rbl2	Rab11b	Timm13

## Alle signifikanten Genlisten

Rbm28	Ran	Tlcd1
Rbm39	Ranbp1	Tloc1
Rcl1	Ranbp5	Tmem41a
Rdh10	Rars2	Tmem55a
Rdh9	Raver1	Tmem63a
Reep4	Rcc2	Tnpo3
Retsat	Rec8L1	Trim37
Rhbdd1	Reep3	Trmt1
Rhot1	Rfng	Tspan12
Rin2	Rhobtb3	Tspan31
Rnu32	Rin3	Ttyh2
Robo4	Rnu32	Txlna
Rpl12	Robo4	Txndc10
Rpl13	Rogdi	Txndc12
Rpl14	Rpl10a	Txnrd1
Rpl18	Rpl13	Tyms
Rpl18a	Rpl17	Ubap2l
Rpp30	Rpl18a	Ube2e1
Rps2	Rpl19	Ube3b
Rps21	Rpl19	Ubr2
Rps3	Rpl22	Ulk1
Rps5	Rpl23	Usp22
Rps6	Rpl24	Vars
Rps7	Rpl27a	Vps26a
Rrp1	Rpl28	Vps8
Rtn3	Rpl29	Wdr1
Sae2	Rpl29	Wdr13
Sash1	Rpl31	Wdr22
Sc5d	Rpl34	Wdr36
Scd1	Rpl36a	Wdr77
Scd2	Rpl4	Wiz
Sdha	Rpl7	Wnk1
Sec11a	Rpl8	Xdh
Sec24a	Rpo1-1	Ywhae
Sec63	Rpo1-1	Yy1
Sel1l	Rpo1-2	Zdhhc16
Selenbp2	Rpo1-4	Zfhx4
Serpinc1	Rpp40	Zfp106
Setdb1	Rps12	Zfp207
Sf3a2	Rps17	Zfp809
Sf3b3	Rps19	Zhx3
Sill	Rps20	Zmiz1
Slc11a2	Rps21	Zw10
Slc12a2	Rps24	
Slc12a6	Rps28	
Slc17a3	Rps3	
Slc23a2	Rps3a	
Slc24a6	Rps5	
Slc25a10	Rps6	
Slc2a8	Rps6kb1	
Slc30a6	Rps7	
Slc31a1	Ruvbl1	
Slc31a1	Ruvbl2	
Slc35a2	Rxrb	
Slc39a14	Sars	
Slc6a13	Sars	
Slc7a2	Sc5d	
Smap11	Scd1	

## Alle signifikanten Genlisten

Smarca2	Sdc4	
Smarca4	Seh1l	
Smarcc2	Sept4	
Smc1a	Serpinf2	
Smu1	Setd8	
Snx17	Slc19a1	
Snx19	Slc25a12	
Snx9	Slc31a1	
Sord	Slc36a4	
Spast	Slc39a11	
Spnb2	Slc43a1	
Srm	Slc44a3	
Srpr	Slc5a6	
Ssh2	Slc7a6os	
St6gal1	Slc9a8	
Steap3	Slco2a1	
Stk3	Slco2b1	
Stra13	Smarcc1	
Suhw4	Smyd2	
Taf15	Snd1	
Taf3	Snora65	
Taldo1	Snrpa1	
Tbc1d14	Snrpd3	
Tbc1d24	Srm	
Tbrg1	Ssr4	
Tdo2	Stau2	
Timm13	Stra13	
Timp3	Suhw2	
Tlcd1	Supv3l1	
Tle1	Tada2l	
Tmsb4x	Taf9	
Tnpo3	Tars2	
Tns1	Tbl3	
Tob1	Tbrg4	
Tomm40l	Telo2	
Tor1b	Tfb1m	
Tor2a	Tfdp1	
Trim33	Tgfbr3	
Trmt1	Thada	
Trp53bp1	Timm23	
Trpm7	Timm50	
Tspan33	Timm9	
Tsr1	Tkt	
Ttyh2	Tm7sf2	
Txndc10	Tmem55a	
Txn14	Tmem63a	
Txnr1	Tmem69	
Tyw1	Tnfsf5ip1	
Ubap2	Tnpo3	
Ubap2l	Tom1l1	
Ube1dc1	Tomm22	
Ube2v1	Tpp2	
Ube2v2	Trap1	
Ubx6	Trim28	
Ugt1a6a	Trmt1	
Ugt2b35	Trmu	
Upp2	Trub1	
Usp22	Tsnax	

## Alle signifikanten Genlisten

Usp39	Tspan12	
Vars	Tspan7	
Vps26a	Tsr1	
Vps39	Ttc27	
Vsig4	Tufm	
Wdr1	Twsg1	
Wdr55	Txndc5	
Wdr74	Ube2m	
Wdr77	Ube4a	
Wdte1	Ube4b	
Wnk1	Uchl3	
Xpc	Unc13b	
Xrcc4	Utp20	
Yes1	Vars	
Yipf4	Vipr1	
Ywhae	Vps13a	
Zbtb20	Vps53	
Zdhhc6	Wdr22	
Zfand2b	Wdr36	
Zfp106	Wdr36	
Zfp281	Wdr40a	
Zmiz1	Wdr55	
Zw10	Wdr77	
Zyx	Xpo4	
	Xrcc5	
	Xrcc6	
	Yars2	
	Zfp369	

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

Run_2009_12_11_355			
Name	Ergebnis	Sequenz	
Mybbp1a_K_F	Mybbp1a	CANTCTGGANCTCTCCCTCCCTGGCTAGCATATCTCCCGACAAGCTNGAGTCACCTCATGGNCTCGGTTGACCTGTTCTCAGAAGACAATATCCAGTCTGGTGAACATCCTGAAGTGGCCGCAACTCTGTCAAGAGGAGCACAAGCTGCC TAATGTGGCTCTGGACCTGCTCCGCTGGCTCAAGGAGAGCAGATTCGAACTGTTCTGGAAGAAGTTTTGGAGG AGGGCTGTGAAGAAATCCGCTCTGGACATCCAGCTACATGTGCTTCCGCTACTGGGTGCGTCTCT	
Mybbp1a_K_R	Mybbp1a	CAAAANGCCCCNGTAGCGGGAAGCTNTCTCAGCTGGATGTCAGGAACGGATTCTTNNCAGCCCTCCTCCAAAAC CTCTCCAGAACAGTTCGAATCTGCTCTCCTTGAGCGCCAGCGGAGCAGGTCCAGAGCCACATTAGGCAGCTTGT GCTCCTTCTTGACAGAGTTGGCGCCACCTTCAGGATGTTCAACAGACTGGGAATATTGCTTCTGAGAACAGGTCAA CCGAGCCCATGAGTGACTCGAGCTTGTGCGCACCTCTGCTTAGCCAGGAGGAAAGAGCTCCAAGTAC	
Mybbp1a_Da_F	Rab7	TGNANNTCTCTCCTGAACCAGTATGTTCTCCAAGTTCAGTAACCAGTACAAAAGCCNCTTTTCAGGAGCGGACTTTC TGACCAAGGAGGTGATGGTGGACGACAGACTTGTTACCATGCAGATCTGGGACACAGCCGGTCAAGAACGGTTCCAG TCTCTGGTGTGGCTTCTACAGAGAGCAGTTGCAGTTGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	
Mybbp1a_Da_R	Rab7	TAGCCCCAGACTGGACCGTCTTGANTCTCGTGTCCAGATNNGCATGGTAACNANTCTCGTCTCCACCATCACCT CCTTGGTCAGAAAGTCCGCTCTATTGTGGCTTTGTACTGGTACTGAACTTCTTGTTCACATACTGGTTTCATGAGAGA GGTCTTCCAAACACCAGAGCGGAGNGATCACTTTCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	
Mybbp1a_Ta_F	no sig	GGTTCNAATCTGAANANAGGCCCTTTTCCCTGGTCTAGAGAANGTGGTCTGCTGTGCCCTCAGCTCTAGGCACA GGGTCAACCTTGCCAGGCACCCCTGCTTCCCCAGNTGACTTTGGCCAGGGCTCAAGCCCTTCTCCACAGGCTTC TCTAAGTGACCATGGCCACGGGCTTTGGCCATTGACCATCTTCTGTTCCAGAGGAGCAGTTGCAGTTGANNNNN NNNNNNNNNN	
Mybbp1a_Ta_R	no sig	NGGTCNATGGCCAAAGCCCGTGGNNTCNCCTCNCCTTAGGAGAAGCCCTGTGGAGTTTTTCNGCTTGAGCCCTGGCCN AGAGCTCAGCTGGGTGAAGTCTAGGGTGTGCCGTGGNAAGGTGGCCCTGTGCCCTAGAGCTGAGAGCCACAGTCATACC GAACCACAGANGACCAGGCCAGAGGGCCCTCTGTTCCANAGTTGAAAACCCNNAGTTTATAGAGCGGAGGNATCACTTTC AANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	
Mybbp1a_NTR_F	Mybbp1a	CGATGTTGTNGNTCTCCTCCTGGNTAANGTTCNTTCCCGACGAGNAAAANGGANTCNTNTTNCCTGGTTGACCTGTT CTCAGAAGACAATATCCAGTCTGGTGAACATCCTGAAGGTGGCCGCAACTCTGTCAAGAAGGAGCACAAGCTGCC TAATGTGGCTCTGGACCTGCTCCGCTGGCTCAAGGAGAGCAGATTCGAACTGTTCTGGAAGAAGTTTTGGAGG AGGGCTGTGAAGAAATCCGCTCTGGACATCCAGTACATGTGCTTCCGCTACTGGGTGCGTCTCT	
Mybbp1a_NTR_R	Mybbp1a	AATGTTNNAANTNCCAGTAGCGGAGCNTTTCAGCTGGATGAACAGNACGGATTCTTCTCCAGCCCTCCTCCAAAA CCTTCTCCAGAACAGTTCGAATCTGCTCTCCTTGAGCGCCAGCGGAGCAGGTTCCAGAGCCACATTAGGCAGCTTGT GCTCCTTCTTGACAGAGTTGGCGCCACCTTCAGGATGTTCAACAGACTGGGAATATTGCTTCTGAGAACAGGTCAA CCGAGCCCATGAGTGACTCGAGCTTGTGCGCACCTCTGCTTANCCAGGAGGAAAGAGCTCCAAGT	

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

Tfdp1_U_F	Tfdp1	TCNACAGTGGTANTGGCCGCTCANATNCNCCAGCATCCACACTATTGTGGTAGGANNCCACACTCCCAACACGCATTTTGTGTACAGAAACCAGACGCTGACTCCTCACCTTGGTCTGTGGAAAGCGAAACAGGAAGGCGGAGAAGAATGCAAGGGCTGCGGCATTTCTCCATGAAGGTGTGAGAAAGTGCAGAGGAAAGAAACCCACCTCCTACAATGAGGGTGGCTGACGAANNNNNNNNNN
Tfdp1_U_R	Tfdp1	GGTCTTCTCTGCCCCTTCTCCACACCTTNCCTGGAGAAATGCCNCANGCCCCTTGCCATTCTTCTGCCCTTCTCTCCGCTTCCAGACCAAGGTGAGGAGTCAGACGCTGTTCTGTGACACAAAATGCGTGTGGAGTGTGGGCTTCTACCACAAATAGTGTGGATGCTGCCGGTCTCTGAGGCGTGCCAAATCACCACTTGTGTGATATTGACATTTGGACTGTCCGAAANNNNNNNNNN
Tfdp1_D_F	Tfdp1	TCNGCAGTGGTATTGGCCGCTCANATNCTCAGCATCCACACTATTGTGGTAGGAAANCCACACTCCCAACACGCATTTTGTGTACAGAAACCAGACGCTGACTCCTCACCTTGGTCTGTGGAAAGCGAAACAGGAAGGCGGAGAAGAATGCAAGGGCTGCGGCATTTCTCCATGAAGGTGTGAGAAAGTGCAGAGGAAAGAAACCCACCTCCTACAATGAGGGTGGCTGACGAANNNNNNNNNN
Tfdp1_D_R	Tfdp1	GGTCTTCTCTGCCCCTTCTCCACACCTTCTGGAGAAATGCCNCANGCCCCTTGCCNTTCTTCTGCCCTTCTCTCCGCTTCCAGACCAAGGTGAGGAGTCAGACGCTGGTTCTGTGACACAAAATGCGTGTGGAGTGTGGGCTTCTTACCACAAATAGTGTGGATGCTGCCGGTCTCTGAGGCGTGCCAAATCACCACTTGTGTGATATTGACATTTGGACTGTCCGAAANNNNNNNNNN
Tfdp1_T_F	Tfdp1	TCNACAGTGGTATTGGCCGCTCANATNCNCCAGCATCCACACTATTGTGGTAGGANNCCACACTCCCAACACGCATTTTGTGTACAGAAACCAGACGCTGACTCCTCACCTTGGTCTGTGGAAAGCGAAACAGGAAGGCGGAGAAGAATGCAAGGGCTGCGGCATTTCTCCATGAAGGTGTGAGAAAGTGCAGAGGAAAGAAACCCACCTCCTACAATGAGGTGGCTGACGAANNNNNNNNNNNNNNNNNN
Tdp1_T_R	Tfdp1	GGTCNTTTCNTCCNGCCCTTCTCCNACNTTCTGGAGNAAATGNNAANAGCCCTTGCCCTTCTTCTGCCCTTCCGTCCGCTTCCAGACCAAGGTGAGGAGTCAGACGCTGTTCTGTGACACAAAATGCGTGTGGAGTGTGGCTTCTTACCACAAATAGTGTGGATGCTGCCGGTCTCTGAGGCGTGCCAAATCACCACTTGTGTGATATTGACATTTGGACTGTCCGAAANNNNNNNNNN
Tfdp1_N_TR_F	Tfdp1	TCCNAGCAAGTGGTATTGGCCGCTCANATNNCNCAGCATCCACACTATTGTGGTAGGANNCCACACTCCCAACACAGCATTTTGTGTACAGAAACCAGACGCTGACTCCTCACCTTGGTCTGTGGAAAGCGAAACAGGAAGGCGGAGAAGAATGCAAGGGCTGCGGCATTTCTCCATGAAGGTGTGAGAAAGTGCAGAGGAAAGAAACCCACCTCCTACAAATGAGGGTGGCTGACGAAANNNNNNNNNNNNNNNNNN
Tfdp1_N_TR_R	Tfdp1	NNNNNNNNNNNNNNNTTTCGGACAGTCCAAATGTCAATACACAGCAAGTGGTATTGGCAGCCCTCAGAGACCGCAGCATCCCAACACTATTGTGGTAGGAAAGCCCAACACTCCCAACAGCATTTTGTGTACAGAAACCAGACGCTGACTCCTCACCTTGGTCTGTGGAAAGCGAAACAGGAAGGCGGAGAAGAATGCAAGGGCTGCGGCATTTCTCCATGAAGGTGTGAGAAAGTGCAGAGGAAAGAAACCCACCTCCTACAAATGAGGGTGGAGAGGGAGAGAAAGACC

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

Run_2009_12_15_356			
Name	Ergebnis	Sequenz	
Mybbp1a_Db_F	Mybbp1a	CAGTCTTGAAACTTCCTCCTGGCTAAGCAGATTCNGCCGACAAAAGCTNGAGTCACCTCATGGNCTCGGTTGACCTGTTCTCAGAAAGACAATATCCAGTCTGGTGAACATCCTGAAGGTGGCCGCAACTCTGTCAAGAAGGAGCACAAGCTGCCTAATGTGGCTCTGGACCTGCTCCGCTGGCTCAAGGAGAGCAGATTCGAACTGTTCTGGAAGAAGTTTTGGAGGAGGGCTGCTGAAGAATCCGTCCTGGACATCCAGCTACATGTGCTTCCGCCCTACTGGGTGCGTCTCTGCCGCTTCGTGTCAGAGGAGCAAGTTGCAGTTGANNANNNN	
Mybbp1a_Tb_F	Mybbp1a	CANTCTTGAAACTTCCTCCTGGCTANCAAGATTCGCCGACAAAAGCTCGAGTCACCTCATGGGCTCGGTTGACCTGTTCTCAGAAAGACAATATCCAGTCTGGTGAACATCCTGAAGGTGGCCGCAACTCTGTCAAGAAGGAGCACAAGCTGCCTAATGTGGCTCTGGACCTGCTCCGCTGGCTCAAGGAGAGCAGATTCGAACTGTTCTGGAAGAAGTTTTGGAGGAGGGCTGCTGAAGAATCCGTCCTGGACATCCAGCTACATGTGCTTCCGCCCTACTGGGTGCGTCTCTGCCGCTTCTGTCAGAGGAGCAGTTGCAGTTGANNANNNN	
Mybbp1a_Db_R	Mybbp1a	CGNCGAANGCCCCAGTAGCGGAGCNTTCTAGCTGGATGNCCAGGACGGATTCTTACCAGCCCTCCTCCAAAACCCTTCTCCAGAACAGTTCGAATCTGCTCTCCTTAGCGCCAGCGGAGCAGGTCAGAGCCACATTAGGCAGCTTGTGCTCCTTGGACAGAGTTGGCGGCCACCTTCAGGATGTTACCCAGACTGGGAATATTGCTTCTGAGAACAAGGTCAACCGAGCCCATGAGTGACTCGAGCTTGTGCGCACCCCTCTGCTTAGCCAGGAGGAAAGAGCTCCAAGTACTTGGGAGAGCGAGGGATCACTTTCAANNNNNNNNNN	
Mybbp1a_Db_R	Mybbp1a	CGAGNGCCCCAGTAGCGGAAAGCTTNTAGCTGGATGNCCAGGACGGATTCTTCCNAGCCCCCTCCTCCAAAACCCTCTTCCAGAACAGTTCGAATCTGCTCTCCTTAGCGCCAGCGGAGCAGGTCAGAGCCACATTAGGCAGCTTGTGCTCCTTGGACAGAGTTGGCGGCCACCTTCAGGATGTTACCCAGACTGGGAATATTGCTTCTGAGAACAAGGTCAACC	
Mybbp1a_Tb_R	Mybbp1a	GAGCCCATGAGTGACTCGAGCTTGTGCGCACCCCTCTGCTTAGCCAGGAGGAAAGAGCTCCAAGTACTTGGGAGAGCGGAGGGATCACTTTCAANNNNNNNNNNNN	
Run_2009_11_25_349			
Name	Ergebnis	Sequenz	
Mybbp1a D	Tead1	CCCCCTCCGGGNCNAAGNNGAAAANNNTTCCCTTCCCNNGGGNNNNNGAAAAANNNNNNNGtCCCCGCNC CGNGNCCNGCGGNCCNCTTNCCTCCCGCGGGGNGGGGAGAAAAAANAACNGNGCCNCCNCGG GNCGGGGGGGGGNCACACcggGcGGGGGCTtCCGCattgCggCAGGGAAA.ctCCGCGNCCNCCCGGGGCC CNCNNNNCCGCCNNNGCNCNACAGCCCNCGTCCCTCTCCCGCGGGNCGNCCCGGCCCGCCCGGNG	
Mybbp1a T	no sig	GGNGAGCGGGCGNNNGNAGNGGGGNGGNGGCCNCCGNGNGGANAANGNGNGNCGNCCGGNCCGGNNGCGG GCNNGGGGGAAGNGGGGCNNGAGGCNNGNNGNCGNANNCNCTNCNCCGGCGNGGGCGGCGCN GCNNGNGGGGGGCGGGGGGGGNGGGCNAAGNANGGGGGGGGGCCNCCCCCCCCCN	









Alle Sequenzen der Sequenzierungen

		GTGGCTGACGAGCTGGTGGCAGAGTTCAGCGCTGCCGACAAACCACATTCTACCAAACGAATCAGCTTATGACCAGAA GAAACATCCGGCGGTGTCTACGATGCCTTAAATGTGCTAATGGCCATGGAACATCATCTCCAAGGAGAAAGGAGAGA TCAAATGGATCGGCTGCCCAACCAACTCAGCTCAGGAGTGCCAGAACTTAGAGGTAGAGAGGCAGAGGAGGCTGGA GAGGATCAAACAGAAAGCAGTCACAA
Btbd1_d _fwd	St6gal1	CCATACCAGCTGCTANCTGCTNATGTTTCTCTNGAAAAGAGAATAATCAGTGCCCTCGCANNAGTCTACTGNATGAACTG GCCCTTGTAGCCTTCCCAAAATACCTGGTACCACACTTCCAGCCGGATGCTGAGATGGTTTTGATCATCCTGTGAA AAATGAGCCTTGGCTCCAGACCTAGTAAAGTAAACCTCTTCCCATGGAGAACAGTGCTGGCTCCTGAGGACCTGGA AGGCCCAAGCCCAAGGATTAGCCAGAAAGCAGGCTGGTTCCCTGCTCCGATCAGTGGCTCCTGCCCCGTACCA TTCATTATGATTACAACTTGAAGAGAAAGTTCAGCTGCTTGTCTGCTTTCCTGTTTCCCATCATCTGCG TGTGAAAGAAAGGAGCGACTATGAGGCTCTTACATTGCAAGCCAAAGTATCCAGATGCCGAAGAGCCAGGAGAAA GTGGCCGTGGGCCCTGC
Tfdp1_nt r_rev	Tfdp1	CTNCGATGGGCTGTNACNATTTCTGTCCANGTATTCNTCTAGAGCTTTTGGTACCAAACTTCTGGCCACCTTGAGGT CTTCAGCAGAGCAGTTGCCAGACTCCAGCCACATGCCATGCCCTTGAGCACCTCAATGTCAATCGTGGATCT CAAACGTGTGTCAAAGTTAAACAGATACTCAAATTTGTCAATTGGAGATGCTGCAGTCAATGACTGCTTCCCTGCTGGT GTTGACAAATGATGAAGGGCAAGTGGATGACAGAGTTGGAGGAGGGCCCTGCGGCCCTGCTCAGCTTGGCCGA TTTCTCTGCACCAAGTCTTGAAGGCAATTTGCTGCAGGATGAGCTCCTGGAGCTGTGACTGCTTCTGTTTGTATCCTCT CCAGCCTCCTCTGCTCTACCTCTAAGTTCTGGCACTCCTGAGCTGAGTTGGTGGCAGGCCGATCCATTGATCT CCTTCTCTCCTTGGAGATGATGT
Tfdp1_k_ rev	Tfdp1	CNNGTGGCCNGTGANNCAATTTCTGTCCGTTTTCTAGAGCTTTTGGTACCAACTTCTGGCCACCTTGAGGTCT TCAGCAGAGCAGTTGCCAGACTCCAGCCACATGCCATGCCCTTGAGCACCTCAATGTCAATCGTGGATCTCA AACGTGTGTCAAAGTTAAACAGATACTCAAATTTGTCAATTGGAGATGCTGCAGTCAATGACTGCTTCCCTGCTGGTGT TGACAAATGATGAAGGGCAAGTGGATGACAGAGTTGGAGGAGGGCCCTGCGGCCCTGCTCAGCTTGGCCGATT TCTCTGCACCAAGTCTTGAAGGCAATTTGCTGCAGGATGAGCTCCTGGAGCTGTGACTGCTTCTGTTTGTATCCTCTCC AGCCTCCTCTGCTCTACCTCTAAGTTCTGGCACTCCTGAGCTGAGTTGGTGGCAGGCCGATCCATTGATCTCC TTCCTCTCCTTGGAGATGATGTTTCAT
Tfdp1_D _m_E1_ Fwd1	no sig	CTGCTNCCGGCGGCTGCGGCCCTCNNNCTGNANCCGGCNTGTGGNCGTGTGTGCNCCCACGTGGCTGACGAAT ACGCTGANGTGGCTGACNATNCNCTGANGTGG
Tfdp1_d _rev	Tfdp1	CCNNNTGGATNNTNNCATTNATGTCGCGTTTTCTCTAGAGCTTTTGGTACCAAAACCTCTGGCCACCTTGAGGTCTT CAGCAGAGCAGTTGCCAGACTCCAGCCACATGCCATGCCCTTGAGCACCTCAATGTCAATCGTGGATCTCAA ACGTGTTGTCAAAGTTAAACAGATACTCAAATTTGTCAATTGGAGATGCTGCAGTCAATGACTGCTTCCCTGCTGGTGT GACAAATGATGAAGGGCAAAGTGGATGACAGAGTTGGAGGAGGGCCCTGCGGCCCTGCTCAGCTTGGCCGATT CTCTGCACCAAGTCTTGAAGGCAATTTGCTGCAGGATGAGCTCCTGGAGCTGTGACTGCTTCTGTTTGTATCCTCTCCA GCCCTCCTCTGCTCTACCTCTAAGTTCTGGCACTCCTGAGCTGAGTTGGTGGCAGGCCGATCCATTGATCTCCT TCTTCTCCTTGGAGATGATGT

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

Tfdp1_T _m_E1_ Fwd1	no sig	AATGAGGTGGCTGANGANGCTGAGATTNCNNTCCAAAGGAAAANGATCNTGNGGTTTCNGACGAAANNNGNANAAN NNNNN TTNACGGGAGACNCCTGGGGTAGGNTTCTGGCTTGAC TTGNCTGTGACCTGGGNTAACCTGAGGATCTGAACGCCCT CCTTAGGGTCTTGTGTTGAGAACACAGCCTGGGAGCAGGCCACCGCCACTTTCTCCTGGCTCTTCGGC ATCTGGAATACCTTGGCTTGCAATGTAAAGACCTCATAGTCGCTCCCTTTCTCCACACGAGATGATGGCAAACAGG AGAAAGACCAGGACAAAAGCAGCTGAAC TTTCTCTTCAAGTTGGTATGAATCAATAATGAATGGTACGGCAGGAGAGCC ACTGATCGGAGCAGGAACCAAGCCTGCTTCTGGCTAATCC TCTGGGCTTGGGCCCTCCAGGCTCCAGGAGCCAG CACTGTTCTCCATGGGAAAGAGGTTACTTACTAGGCTGGAGGCCAAGGCTCATTTTTACACAGGATGATCAAAAACC ATCTCAGN
Run_2010_06- 17_389		
Name	Ergebnis	Sequenz
Btbd1_K _fwd	no sig	GGAGGGNTGNNNGCNGTCCGTTNGTNAANNAANNNNNNTTTTTNNCCCCCCCCCTCGGGGGANAAA AAAGANNNTTTTTCCCCNNNCNNGNCGNAGANTNGNNGNT
Stat1_T_ _rev	Stat1	TCTGCCGCAAGNACTCGANTCTGGGCAAAATCTCTTCTGCGCGCTCAAGCAAGTGTCCAAAGTGGTCTGAGGGCGG CGTCCCGGAGGCTCCAGGGAGCTTIGACAGACTCGGCGCTGAAAACCGAAAAGTACCGANNNNNNNNNN
Btbd1_D _fwd	Btbd1	CGGTCNNNCTNAGCACCTGCCAATGTTCCNCCCAGCGTGCNNAACACTCAAGGGCCAGATTCCTACTATGGCA CAAAAGGACTGAAGAAAGTAGTGCATGAGACCCCTGCTGCAAGCAAGACTGTTTTCTATTTTCAGTTCCTCCCTGGCAA TAACAAATGGCACATCAATAGAAGATGGACAAATACCAAGAAATAATTTTTATACATAATCTAGTGTAAACCAATTCAGTCTA ATCTCAAAAAGCATAAAACAACCTGGCCACAAATAGTTTGAGTGTCTTGAATTTATAATTACAG
Stat1_K_ _rev	Stat1	TNTGCCGCAAGNACTCGAGTCTGGGCAAAATCTCTTTCGCGCCGCTCAGCAAGTGTCCCAAGTGGTCTGAGGGCGC GGTCCCGGAGGCTCCAGGGAGCTTIGACAGACTCGGCGCTGAAAACCGAAAAGTACCGANNNNNNNNNN
Btbd1_T _fwd	no sig	CACAAANCNAGTANGTNTNTCTATACTACTGAGACTTCA TGTTAACAAAAGTATA TTGGTTATCTCTCCTGCTTTTTC TCTTATTAATAGCTTTACATCTTACTTTAGCTCACATAACCAGCGCATCTGAGTGAAGCCACCTTTCAGGCTTTGA AGGACTCAGCCCTTGTACTGTATTTCCCTTTTAGGAGGACTACATGCTGCTTGGGATTTGTTAGTGCACAAGAT GCATCCTCTGTAATTTCCGAGTGATATTTGGAAAGTGGGCTACTGAGATGGTTG
Ugt1a6a _6_fwd	Ugt1a6a	CNAANGCTNTTGTGGGACNACTGCCTCCATTTCCGTCAC TTTCCNAGGATGGCTGTNTTCTCCTGCTGCTCA GACACTTCTGCAGGTTTCTCTTCCCTAGTGTCTTGGCCCTCAGTTCTAGGTGACAAAGCTCGCTGGTCCCTCCAGG ATGGAAGCCACNGNATTNANCATGAAGGAGAAAANNNNNNN
Btbd1_K _rev	no sig	CAGNGGTGGTGTNTCNNGGCTANTTTCNGTTGCTCGAAGGNATCATNTCNACNCTGGTGGTNTGGATTGNNGNNC NCCACTAGNATNACTTNC TTTNAATCTCACTCTNACNNGCAACCTGGAACACTTGNAGAAATGTAGANGCNCNCTGN

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

		CTGTATANGTNGGAGAAAGGTGGTTGTNTCCNGATTTTGGCAAGNNTGNNTNCTATNTNTTTTGCTGTANTTGC CCCTNAGNCNCTGNCNATATCTGTTTCATGTTTCNAGACGCGNTNGCACGNTCTGCTATCGAATGTNC
Ugt1a6a _T_fwd	Ugt1a6a	GNC TTTNTGGTGGNNCAACTGCCCTCCATTTCCNGTCAC TTTCCAAAGGGATGGCTTGCCTTCTCCCTGCTCAGACA CTTCCCTGCAGGGTTCTCTTCCCTAGTGTCTTGGCCCTCAGTTCTAGGTGACAAAGCTGCTGGTCCCTCCAGGATGGA AGCCACTGGCTTAANCA TGAAGGAGAAANNNNNNNNN
Btbd1_D _rev	Btbd1	CAANGNCGNAAACTCTNNGATCTGTTTATTTCCATTGTGAATTTATACAAACTCCACTTCCAGCTGTAAAAACAGTGCTA TGTGATGCAC TCTATACTGTTACAGAA TACCTTCCCTGTAATGCAC TGTAAACTTTTCTTGAGTGT TTTCTAGGCATTAT TCCAAAAGGTAATGACCACATATTTGAAAACCCCAAATATAAAGTCAGTTTCTTAATTTCTGAAATTAGTTATTTGAGT TAAAAGAA TTTGTAGGAATACTCACCCATCTCATCTA ACTTTCAAAACAGTTAAAA
Ugt1a6a _K_fwd	Ugt1a6a	ANGGCTTTNTGGTGGNNCAC TGCCCTCCATTNCAGTCAC TTTCCAAAGGATGGCTTGCCTTCTTCCCTGCTCAGACA CTTCCCTGCAGGGTTCTCTTCCCTAGTGTCTTGGCCCTCAGTTCTAGGTGACAAAGCTGCTGGTGGTCCCTCCAGGATGGA AGCCACNGNCTTANCA TGAAGGAGANAANNNNNNNNN
Btbd1_T _rev	no sig	CCNNTATGNCCACTCATAGCNTCCTTCCAAAATACACTCGGAAATACNGAAGGATGCATCTTGTGCAC TACAAACAA TCCC AAGACAGCATGTAGTCTCTCC TAAA AAGGAAA TACAGTACAAAGGCTGAGTCCCTTCAAAGCTGAAAAGGTGGG CTTCACTCAGATGCCCTGCCTGGTTATGTGAGCTAAAAGTAAAGCTATTAATAAGAGAAAAAGCAGGAGAGATA ACCAATATACTTTTGTAAACATGAAGTTCTCAGTTAATCTAGAGTAATAAGTACATACTTGAT
Ugt1a6a _6_rev	Ugt1a6a	CTCACCTGGGGCCCCAGCANC TTTGTCCTTNTCTGAGGCCCAAAGCACTAGGAAGANAACCTGCAGGAAAGTGTCTG AGCAGCAGGAAGCAAGCCATCCTTGGAAAGTGACTTCTTCTGGAGGCAGTTGATCCCAACCAATAAAGACCATGT TAGGCATCACAGGCTGGGGAAC TAAANNNCNNNNNNNN
Stat1_T_ _fwd	Stat1	NTGNAACTCCTGGNGCCTCCGGGNCGTCTCCCTCAGNACCAATTTGGACACTGCTGAGCGGGCCAGAGAGATTT GCCCAGACTCGAGCTCCTGCGTGCAGTGAGTGAGAGCCAGTCGTTTCAGAAANNNNNNNNNNNN
Ugt1a6a _T_rev	Ugt1a6a	TCCTCCTGGGGCACCAGCANC TTTGTCCCTTNTCTGAGGCCCAAAGC ACTAGGAAGAGAAACCTGCAGGAAAGTGT TGAGCAGCAGGAAGAAAGCAAGCCATCCTTGGAAAAGTGACTTCTTCTGGAGGCAGTTGATCCCAACCAATAAAGACCAT GTTAGGCATCACAGGGTCTGGGGAAC TAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Stat1_K_ _fwd	Stat1	NTGNAACTCCTGGAACCTCCGGNCTTNCCTCCTCAGACCAATTTGGACACTGCTGAGCGGGCCAGAGAGATTTGC CCAGACTCGAGCTCCTGCGTGCAGTGAGTGAGTGAGAGCCAGTCGTTTCAGAAANNNNNNNNNN
Ugt1a6a _K_rev	Ugt1a6a	TCCTCCTGGGGCCCCNGCANC TTTGTCCCTTNTCTGAGGCCCAAAGC ACTAGGAAGANAACCTGCAGGAAAGTGTCT GAGCAGCAGGAAGAAAGCAAGCCATCCTTGGAAAAGTGACTTCTTCTGGAGGCN GTT GATCCCAACCGNTAGAGACCA TGTTNGGNATCTANAGGCTGGGGAAC TAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Run_2010_07- 28_395		
Name	Ergebnis	Sequenz

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

Ankfy	no sig	CAGNGGCCGAGATTNGGNAGCTCTTTCCNTCCAGACATTAAAAANGACCNGTNTTCCCATGNCTNNCTNCGNNGNNCGGGACNTCTTCTNGTNGGNCCTCCCATGNTTTCATCTTGACTGNNNCCNCCCACGNCCGTTNNGCANGCTGNGTNGTNCAGNAATTTNTNGCNCCTTATCTANAANTCAACCNCTGCCNACAGCTNNCANTNCTCCCTCCCTNNGNANTCTGTGNTGTCCNGCACNGCNCNNGCNCNGCATCATATGTCNCCGCTGTCACTNCTNGCNGTNTANCTCAGATNTGNNGNNTATAAANTCTCCCTGACTCCACANGCNGCATGCCTCAANGNCTTGNNNNGGCATNAGCNCNGCATGNTCCCTGGGTACNCCACGGNATANATGTCCNNGTGACTCCNNGTNTAAACTCATGCATCTGACGGAGTGC CCCANTTCANCNCTGGGACGCGAGGAAGGAGCTTNGATCCNCTCCTGNTCNCGNCNGCTTGNTCTGTTCAAAAGGCNNGGTGGTAAAAANNNNNN
Ankfy	no sig	TTGCNAAGGCCCTCATCANGTGTACTAGACNACAGGTCCTAAACCTTACTATCTGACAGGATGGCTTGCCCTCTTCC TGCTGCTCAGACACTTCTGCAGGGTTTCTCTTCTAGTGTCTTGGCCCTCAGTCTAGGTGACAAGCTGCTGGTGGT CCCCAGGATGGAAGCCACTGGCTTAANCATGAAGGAGANNNNNNNNNNNNNNNN
Arnt2	Arnt2	CANCATGNGGANGGTTCNNGAATGGCCTTGGCCNTGTGTNNGAGCGANAANCNCAGTATGCTGTGGTCCACTGCAC AGGTTACATCAAGGCTTGGCCACCAGCAGGAATGACCATACCOCGAAAGAACGCTGATGTCGGACAAAGGCAGTAAAT ATTGCCTCGTGGCAATTGGGAGGCTCCAGGTGACCAGCTCTCCTGTGTGATGACATGAGCGGCATGTCAGTGCCTC ACAGAGTTCCTGTACAGGCACAACCTGTGATGGATTATCACGTTTGTGGACCCACAGATGCATCAGTGTGATTGGCTAC CAGCCCCAGGACCTTCTGGAAAGGATATTTGGAAATTTGCCACCTGAGGATCAGAGCCACCTACGGGAGAGCTTC CAACAGGTGTTAAGCTGAAGGGCCAAAGTGTCTCGGTATGTCGGTCCGACCAAGAACCCGGGAGTGGCTGTT GATCCGTACCAAGCAGTTCACCTCCAGAACCCCTACTCTGATGAGATCAGTACGTCTGCAACCAACCCCAATGT CAAGCAACTTCAGCAACAGCAGGCANAACTGGAGGTACATCAGCGAGATGGGCTGTGCTCATATGACTTATCTCAGGT C
Dock7	Dock7	ACNACGTCNCAGGCTGTTGCCCTGTCTCTNGCCACAGAGATTCCTTCAGCCGAAATGAGCCTTCGAAAAATGGAACCTT AAAATACACACTTGTCTATTCTATTTGAAAAAGAACCATGTATTTCAACACTGAGTGTGAGGTCTATTGAAAAATAGGACTT GGATGTCAATTCTGGAAGCAATAGTATTGATTTACTCTCTGAAGAAATGTCTCCAGAAATNANGACNNCCNN
Arnt2	Arnt2	CAGCCATGCGNCGCCCCGAGGGCTGTGCTAGCCCNCTCGGCCATGGACGATACCCTGTTCCAGNTGAAGTTCACAGC GAAGCAGCTGGAGAAACTGGCCAAAGAGGCCGAGAAAGGACTCCAAGGCTGAGCAGGCCAAAGTGAAGAAAGANNNN NNNNNNN
Dock7	Dock7	AGAAACCANGTCCAGGGCTGTTGCCCTGTCACTNGCCACAGAGATTCCTTCAGCCGAAATGAGCCTTCGAAAAATGGA ACTCTAAAAATACACACTTGTCTATTCTATTTGAAAAAGAACCATGTATTTCAACACTGAGTGTGAGGTCTATTGAAAAATAG GACTTGGATGTCAATTCTGGAAGCAATAGTATTGATTTACTCTCTGAAGAAATGTCTCCAGAAATNNGCNCNNNNNCN
Ankfy	no sig	AGNCNATGCGGCGNCCGNAGGGCTGTGCTAGCCCTTTCGGCCATGGAACGAAATACCCCTTGGTCCAGTTTGCAA GTTCACAGCGAAGCAGCTGGGAGAAACTGGCCAAAGAGGCCGAAAGAGGACTCCAAGGGCTGAGCAGGCCCAAAAGT GAAGAAAAAGANNNNNNNNNN
Ankfy	no sig	GTAGCTCTTTTCNNTCCCAGACNNNAAAAAGACCNGTTTTTCCCATGNCTNAGNNNAAGTNCNNGGACATCTTCT NGTGTGNANCCCCATGNTTNTCATCTTACTNNCCANCCCCACGACNNTTNNGNAAGCTGNGTGGTNGNAGGAA ATTTTNGCCCCCTTTCNATAATTCAAANCNCNGCNCNANAGCTGANANTNNTCCCTCCCTNGGGANNCTNTGGGNGTCT

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

		CCCCACAGANTCCNCGGGNGNGNATATNACCCTATNAGANNCGCNGNNTGTATCTTAAATGGGGNTNATAN ATCTCTGCTCCCACNCCGATNCTNAAAGGCTTGGGGTNGGATNAGNNCNGATGNTCNCCTGGGNGNACCANGNG AATATGTCNCCGGACTCCNNGNTAANGNATGGANATGATGAGGCCCCCATTTCAACNCTTGGNGGGGNGNAGGAAGCT TGGGATCNCCCTINGGGGGCNGCTTANGTCTGTTCAAAGGGNNGTGTAAAAANN
		TGNCCTCTGTGGAATTCGAGNCAGCAATCTATGTTCCATCATTTGATGCCCCAGGACACAGAGACTTCATCAAAAACATG ATTACAGGCACATCCCAGGCTGACTGTGCTGTCTGATTTGCTGCTGGTGTGGTGAATTTGAAGCTGGTATCTCC AAGAACGGGCAGACCCGCGAGCATGCTCTTCTGGCTTACACCCCTGGGTGTAACACAGCTGATTTGGTGTCAACAAA ATGGATTCACCCGAGCCACCATACAGTCAGAAGAGATACGAGGAAATCGTTAAGGAAAGTCAGCACCTACATTAAGAAA ATTGGCTACAACCCCTGACACAGTAGCATTTGTGCCAATTTCTGGTTGGAATGGTGACAACATGCTGGAGCCAAAGTCT AATATGCCTTGGTTCAAGGGATGAAAGTCACCCGCAAGATGGCAGTGGCAGTGGCACCCACGCTGCTGGAAGCTTT GGATTGTATCCTACCACCAACTGTCCAACGTACAAGCCCTCGACTGCCCTCCAGGATGCTATAAAAATTGGAGG CATTGGCACTGTCCCTGTGGCCGAGTGAANTGGTGTTCANCCGTGCGGGGTTTNCNITTTTTCNA
Eef1a1	Eef1a1	CGAANGCAAGNNAATGCCCCAGGCTCATCAAAGTCCCTCTATGTTATAGTTGCCANTCNACTGCGTCGGGTCGCCCCGGC ATGGGTAGCATGTCTGGAAACACTTCAGTCTGGCCAGGCTGCTGATGCGAGTGTCTCACCCGCTCTGCTGTCCCGTG ATGCTGGCTCTGCCACTGGGACCAGACCTCCGAGGGCCGCCCCTGGAACCTGCCGCCACTCTGTCCACTCTCAGCAA ACCCCTGGAGTCTTGGCAAGACTGGGGTATGCGTTTCCACTTGGTGAGGAGCAGCTGGGCTGGAGAGAGGACT GTAGGATGAAGGTGAGCCGGTAAAGGTGCTTGATCCAAATCCGAAGGCAGATGACTGCTTGTCTGGGCTGCC CTGGAAACGTTGACGGCTGCCTGTCCATGCCACCTGCCCCTGTTTCAAGTCCGAGAGATCTGGGATATGTTCTGT CCCCGTTGAGGAGGANGACTGAAATGTCAATTCACCTCCAGGCACATGGACCACGGAAGANCTGAAAGGCCCTTGCCCCGANTG CCCCGNCAGGGAATGGACTTCCTTGGGNANTAAATCTGCTGGCTGCCCTGATGCTGAAGCTGAAC
Arnt2	Arnt2	TGCTCTCCCTGTGGAATTCGAGANCAGCAAACTACTATGTTCCCATCTATGATGCCCCAGGACACAGAGACTTCATCAAA AACATGATTACAGGCACATCCCAGGCTGACTGTGCTGCTGATTTGCTGCTGGTGTGGTGAATTTGAAGCTGGT ATCTCCAAGAACGGCAGACCCGCGAGCATGCTCTTCTGGCTTACACCCCTGGGTGTAACACAGCTGATTTGGTGTGTC AACAAAATGGATTCACCCGAGCCACCATACAGTCAGAAGAGATACGAGGAAATCGTTAAGGAAAGTCAGCACCTACAT AAGAAAATGGCTACAACCCCTGACACAGTAGCATTTGTGCCAATTTCTGGTTGGAATGGTGACAACATGCTGGAGCCA AGTGCTAATATGCCCTTGGTTCAAGGGATGAAAGTCACCCGCAAGATGGCAGTGGCAGTGGCACCCACGCTGTGGA AAGCTTTGGATTGTATCTACCACCAACTCGTCCAACGTACAAGCCCTCGACTGCCCTCCAGGATGCTATAAAAAT TGGAGGCATTGGCACTGTNCCTGTGGGCCGAGTGGANACTGGTGTCTCAACCTGNAGGGGTTTNCCTTTTTCNA AAAAANNNNNNNNNNNNN
Eef1a1	Eef1a1	CAGGGCAATGGAAGCTGGAANAATGCATTTTCTCTNGGGACAAGAAGTTACAGGTAGTTGTGAATTTGCTGTGGCT GCCAGAAACCCAGGCTCTGGTAAAGAGCAGTGAATGTCTTAACTGAGCCACCTATCCAGTCCCCTGCTGTGGCCCTG GATCAGCCTCTGCTTGAAGATGACCCAGGTTTGCCTGAATTTGTGGTCCCTCTGCTTAGCTTTAGCTTCTGGAGTGTGGC AGTCATTAGAAATGAAATTTTTCTTAAATTAAGGATCTTTAGAATAACAGGGTTACTTAAACACTCGTTTTTGTCTTG CAAACCTTGCTTTTGAAAAGGCCGTTGCTGTGAGAAATGTCAGCTGTGATCACGGTGTGAGAAATGCTTAAATGCTTTT
Arnt2	no sig	

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

		CTTTCAGGAATGTTGATGAAATCTAATGTCTCTGTCTCTAAAAACAGCCAGTGTCTCTGTGAGTTGGTTACTTGC TAAATTTCTAGGTCACACACTTGTGCTAATGTTTGAAGTATGTTNGGGNGGCTGAAAAANNNNNNAANNNNNN
		CNAATTNCCAAAAGTGGANCTAGGAAATTAGCNTTACCAACTCACACAGGAGACACTGGGCTGTTTTAGAAACAGA GACATTAGATTTATCAACACACTTCTGAAAGGAAAGCATTAAAGCATCTTCCACCCTGATCACAGCTGACATTCT CACAGCAACGGCTTTTCAAAAGCAAGTTTGAAGAACAACAAACGAGTGTAAAGTAAACCTGTATATCTAAAGATC CTTAATTAAGAAAAAATTCATTTCTAATGACTGCCACACTCCAGAAGCTAAAGCAGGAGGACACAAAATTCAGGC AAACCTGGGTCATCTTGAAGACAGAGGCTGATCCAGGCCACAGCAACGGGACTGGATAGGTGGCTCAGTTAACAGC ATTCAGTCTTTACCAAGGACCTGGTTTCTGGCAGCCACAGACAATTCACAACCTACCCTGTAACCTTTGTCCCAAGGG AAAACAATGCATTTCTCCAGCTCCACTGCACCGTACAAAAGGTGNNCCNTNAGCCCNAAAANAANNNNNNNNNN CNNNNNNNNCCNATGCCGCAAGNACTCGAGTCTGGGCAAAATCTCTGCGCCGCTCAGCAGTGTCCCAGTGG GCTGAGGGGCGGTCCTCCGGAGGTCTCCAGGGAGCTTTGACAGACTCGGCGCTGAAAACCCGAAAGTACCCGAANN NNNNNNNNNNNNNN
Stat1	no sig	
Stat1	Stat1	
Ugt1a6a	no sig	NTGNCAANCNTCCCTTGGGNANCNCTCCCGGGNACCNGCTCCCCCTTCAAGAACCACTTTGGGGGACACTGGCTT TGAAAGCGGCGCAGAAAAGAAAGATTTGCCCAGAAACTCGAGCTCCTGCTGCAGTGAGTGAAAGTGAGGCCAGTCCG TTTCAGAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Ugt1a6a	Ugt1a6a	TCATCTGGGGCNCACAGCAGCTTGTCCCTATTCTGAGGCCAAAAGCACTAGGAAAGAGAAACCCTGCAGGAAGTGTCT GAGCAGCAGGAAAGAGGCAAGCCATCCTGTCCAGATAGTAAGGTTAGAGACCTGTGCCCTAGGTAGCACGTGATGAG GGCCCTTGAGCAAGAGTAAGAAATCTGGAAAGTCGGTTTCCAGANNNNNNCNTGTNNGNC
Run_2010_08- 03_399		
Name	Ergebnis	Sequenz
Armt2	no sig	GNGNTCGGCGAACCAAGGCTTNAAGCTGTTTTTNCAGTCTATAANAGAGCATTTGANCTTATATAGCTATTTAAGTTT AAATGTTTTAGGGGGAAGCAAAAAAAGNCTNGGAAATTANCAAAAGCNGGCTNGAAAGCAAACCTCTCNCANCAGT ANGGGCTNGCNGGAANCTTCCNCCTCNGGGAANGCCCGCCAGCTCACCCAAAAGTANCTNCGGGCAA AGCCAAAANNNNNNNNNNNNNNNNN
Gata4	Gata4	AGNGCCGCTTCGCTTCGAANGGANCNGGCCCCCTCTTTGTCACTTCTCGCTGGAGCCGCTCTGGAGCTAGCAGCTGCG CCTGGGTGTAGCAGGCAGAAAGCAAGGACTAGGCTTCTTTAGCCGGTGAANNNNNNNNNNNNNNN
Armt2	Armt2	CCGNCCCTCGNAAGTATGTTCCCANNTGGCANTNCTTCAGCATCACGGACAGAGAAGCGGTGAAGCAGCAGCCTCG CATCAGCAGCCTGGCCAGACTGAAAGTGTCCAGGACATGCTACCCATGCCGGCGACCCGACGCAAGGGACTGGCA ACTATAACATCGAGGACTTTGCTGACCTGGGCATGTTCCCTCCATTTCTGAGTAGCTNCCAGGCAAAAGCCAAAANNN NNNN
Gata4	Gata4	GAGCNGCCGCTTCGCTTCGAANGGNNCGGGCCCCCNCTTGTCACTTCTCNCCTGGAGCCGCTCTGNAGCTAGCAGCT GCGCCTGGGTGTAGCAGGCAGAAAGCAAGGACTAGGCTTCTTAGCCGGTGANNNNNNNNNNNNNNNNN



Alle Sequenzen der Sequenzierungen

		GGGGCTGCTCCCAGGCTGTGTTCTCAACACAGCAAAAGACCCTAAGGAAGCGTTCAGATCCTCAGTTACCCAG GGTCACAGCCCAAGTCAAGCCACAGCCCTCCTTGCAAGGTGGGACAAAGACTCCCCATACCTCAAANTTACCCCCCN GGNTGCTAAAAAANN
		CAGCTTGGNCTCTCCTCTGGCTAGCATACNTNGCCGACNAAGCTCGAGTCACCTCATGGCTCGGTTGACCTGTT CTCAGAAGACAATATCCAGTCTGGTGAACATCCTGAAGGTGGCCGCCAACTCTGTCAAGAAGGAGCACAAGCTGCC TAATGTGGCTGGACCTGCTCCGCTGGCNCCTAAGGAGAGCAGATTGAACTGTTCTGGAAGAAGGTTTTGGAGG AGGGCTGCTGAAGAATCCGCTCGACATCCAGCTACATGTGCTCCGCTTCCGCTACTGGTGCCTCTGCCGCTCTG TCANAGGANTTTTTTTTGGNGATGCMAGGAGACTTATCCNCCNTTNGNNANANTNGTNTTNNNNNNNNNN GGGGGGGGGANNTNNNNANNN NN NN NN
Mybbp1a	Mybbp1a	NN CAAGGANANTTACCTCCGCGNGNTATGGTACCCCTNNTCCAGCCGGAAATGCTGAGATGGTTTTGATCATCCTGTGA AAAATGAGCCTTGGCTCCAGACCTAGTAAAGTAAACCCTTTCCCATGGAGAACAGTGTGGCTCCTGAGGACCTGG AGGGCCCAAGCCCAAGAGGATTAGCCAGAAAGGCTTGGTTCCCTGCTCCGATCAGTGGCTCCTGCCCCGTACCA TTCATTATGATTCATACCAACTTGAAGAGAAAGTTCAGCTGCTTGTCCCTGGCTTCCCTGTTGCCATCATCTGCCG GTGGAAGAAAGGAGCGACTATGAGGCTCTTACATTGCAAGCCAAAGTATCCAGATGCCGAAGCCAGGAGAAAG TGGCCGTGGGCTGCTCCCAAGCTGTGTTCTCAACAGCAACAAGACCCTAAGGAAGCGTTCAGATCCTCAGT TACCCAGGGTCACAGCCAAAGGTCAAAGCCCAAGCCCTCCTNGCAGGTGTGGGACAAAGGACTCCCATACTCAA ACTACC CCCCGGGGTGTAAAAANNNNNNNNN
Stf6gal1	Stf6gal1	CTTCAGGNCTATNATTACACTCCGGTCTGAAGCGTGAGGATGACTACATATTCAGAAAAGCTTCCAAAGCTGTGG AGTGATGTGACTCCTTAAGATTCAAAAAGCTTCATAAAGATGAGGCTGACATTATGATACATTTTGCATTTGGAGCTCA CGGAGACTTCAACTATTTIGATGGCAAAGGTGGTACACTAGCCCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Itpr2	Mmp12	TCNAGCAAAGTGTGATTGGCGGCTCANATNTCCNAGCATCCAAACACTATTGTGGTAGGTAANCCCCACACTCCC AACACGCAATTTGTGTCAACAGAACCCAGACGTCTGACTCCTCACCTTGGTCTGTGGAAAGCGAAACAGGAAGGCGGA GAAGAATGGCAAGGGCTCGGGCATTTCTCCATGAAGGTGTGAGAAGGTGCAGAGGAAAGGAACCACTCCTACA ATGAGGTGGCTGACGAGCTGGTGGCAGAGTTCAGCGCTGCCGACAAACCACTTCTACCAAACGAATCAGCTTATGAC CAGAAGAACATCCGGCGGCTGTCTACGATGCCTTAAATGTGCTAATGGCCATGAACATCATCTCCNAGGAGAAAG GAGATCAAATGGATCGGCTGGCCACCAACTCAGCTCAGGAGTGCCAGAACCTAAANGTANAGAGGCGCAGANGACT GGGAAAAGGATCAANCAGAAACAGTNCAGCTCCCGGNGCTCNTCTGCAACAAAATNGCNTNCAAAAANTTGGTGCAAA AAATCCCCANNTTAAAAACAGGGCCCAAGGGCGCTCCCGCCACTCTGGNTCCNCTNGCCCTTCTCTTGGCAANCCCCCG GGAAAATNTTNTGCCCCN
Tfdp1	Tfdp1	CTTCAGGNCTATATTACACTCCGGTCTGAAGCGTGAGGATGACTACATATTCAGAAAAGCTTCCAAAGCTGTGG GTGATGTGACTCCTTAAGATTCAAAAAGCTTCATAAAGATGAGGCTGACATTATGATACATTTTGCATTTGGAGCTCAC GGAGACTTCAACTATTTTIGATGGCAAAGGTGGTACACTAGCCCAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Itpr2	Mmp12	

Alle Sequenzen der Sequenzierungen

		<p>CGGTCTTCGTCCGTCAACTGGTTCAATCNNAATTTTNCNCCNGCATCCAACANTATTGTGGTAGGTNCCCCACACACTC          CCAACACGCAATTTTGTGTACACAGAACCCAGACGTCTGACTCCTCACCTTGGTCTGCTGGGAAGCGGAACACAGGAAGGGC          GAGAAGAAATGGCAAGGGCCTGCGGCATTTCTCCATGAAGGTGTGAGAAGGTGCAGAGGAAAGGAACCCACCTCCTA          CAATGAGGTGGCTGACGAGCTGGTGGCAGAGTTCAGCGCTGCCGACAACCCACATTTACCAAACGAAATCAGCTTATG          ACCAGAAGAACATCCGGCGGTGTCTACGATGCCTTAAATGTGCTAATGGCCATGAACATCATCTCCCAGGAAGA          AGGAGATCAAAATGGATCGGCCTGCCACCACCTCAGCTCAGGAGTCCAGAACTTAAGGTAGAGAGGCANAAAGANG          CTGGAAGGATCAAAACNGAAGCNGTCAAGCTCCNNGGAGCTCATCCTGCACNAATGGCCINCAAACCTTGGNGCAAAA          AATCCCCAGCTNAACACNAGGCCCCCTCTCCCAATTTGNCAATCCATTGCCCTNNTTGNANCCNAN</p>
Tfdp1	Tfdp1	



## HMMgene Ergebnisse für Arnt2 und Btbd1

### HMMgene Ergebnis für Arnt2

#### HMMgene result

Explanation of [output format](#)

```
## gff-version 1
## date: Fri Feb 5 10:51:25 2016
## HMMgene1.1e (human model sim10gc.C.bsmod)

# SEQ: Sequence 6073 (+) A:1436 C:1622 G:1588 T:1427
Sequence HMMgene1.1e singleex 154 2292 0.971 + 0 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e CDS 154 2292 0.971 + . bestparse:cds_1
# SEQ: Sequence 6073 (-) A:1427 C:1588 G:1622 T:1436
Sequence HMMgene1.1e firstex 3053 3123 0.408 - 2 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e exon_1 2026 2179 0.588 - 0 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e exon_2 1301 1494 0.129 - 2 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e exon_3 429 616 0.248 - 1 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e exon_4 203 271 0.701 - 1 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e CDS 1 3123 0.010 - . bestparse:cds_1
```

### HMMgene Ergebnis für Btbd1

#### HMMgene result

Explanation of [output format](#)

```
## gff-version 1
## date: Fri Feb 5 10:45:41 2016
## HMMgene1.1e (human model sim10gc.B.bsmod)

# SEQ: Sequence 3020 (+) A:856 C:636 G:715 T:813
Sequence HMMgene1.1e singleex 41 1507 0.996 + 0 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e CDS 41 1507 0.996 + . bestparse:cds_1
# SEQ: Sequence 3020 (-) A:813 C:715 G:636 T:856
Sequence HMMgene1.1e firstex 950 1396 0.175 - 0 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e exon_1 476 739 0.952 - 0 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e lastex 56 418 0.543 - 0 bestparse:cds_1
Sequence HMMgene1.1e CDS 56 1396 0.094 - . bestparse:cds_1
```

### HMMgene Legende

#### Columns

1. Sequence identifier
2. Program name
3. Prediction (see table below for the meaning).
4. Beginning
5. End
6. Score between 0 and 1
7. Strand: \$+\$ for direct and \$\$- for complementary
8. Frame (for exons it is the position of the donor in the frame)
9. Group to which prediction belong. If several CDS's are found they will be called cds\_1, cds\_2, etc. 'bestparse:' is there because alternative predictions will also be available (see below).

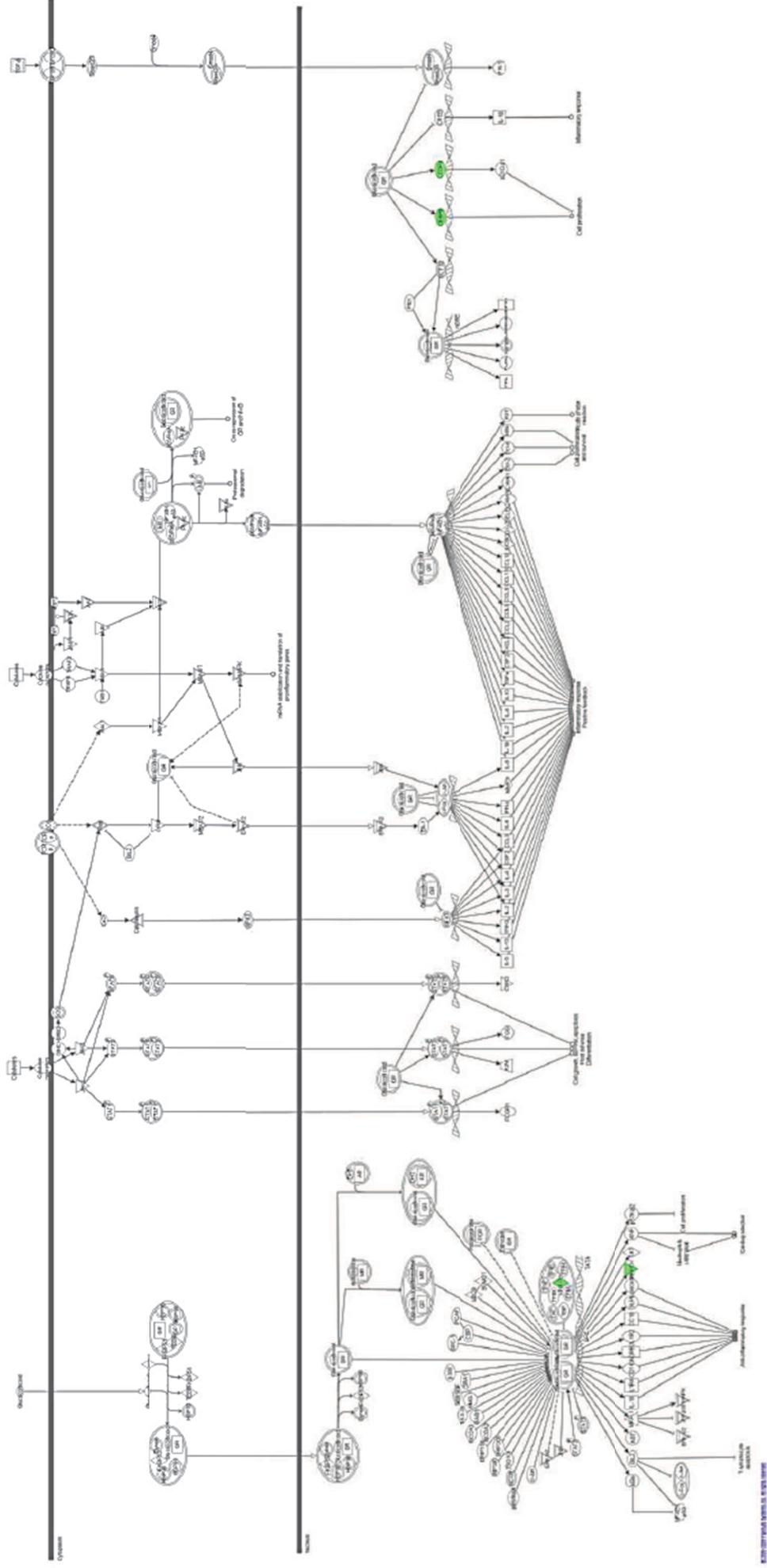
The score that comes with all the exons as well as the entire gene 'CDS' above) is a probability, so a value close to one means that the program is fairly certain. (See 'Known Bugs'.) The program also outputs some comment lines which are preceded by '#'.

## HMMgene Ergebnisse für Arnt2 und Btbd1

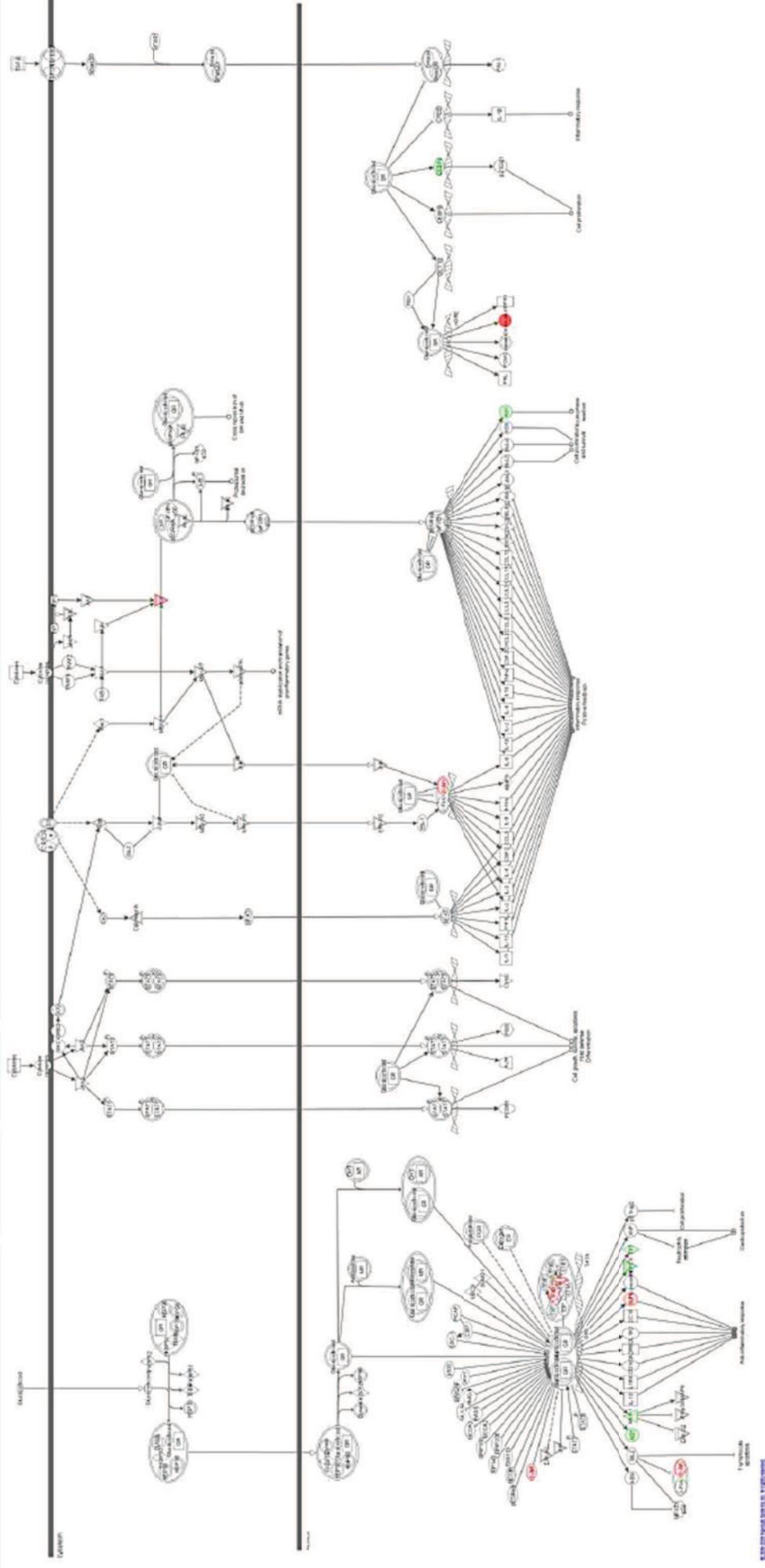
### Predictions

<b>Name</b>	<b>Meaning</b>
firstex	The coding part of the first coding exon starting with the first base of the start codon.
exon_N	The N'th predicted internal coding exon.
lastex	The coding part of the last coding exon ending with the last base of the stop codon.
singleex	The coding part of an exon in a gene with only one coding exon.
CDS	Coding region composed of the exon predictions prior to this line.
START	Predicted start codon with position of first and last base (only with signal option).
STOP	Predicted stop codon with position of first and last base (only with signals option).
DON	Predicted donor site with position of the base before and after the splice site (only with signal option).
ACC	Predicted acceptor site with position of the base before and after the splice site (only

# Glucocorticoid Receptor Signaling (6 Monate)



# Glucocorticoid Receptor Signaling (12 Monate)



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Danele Weinz, geborene Hunecke  
Geburtsdatum: 9. Januar 1980  
Geburtsort: Bünde

### Wissenschaftlicher Werdegang:

29.03.2017 Disputation  
2007 – 2017 Promotionsstudentin an der Leibniz Universität Hannover  
2007 – 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Molekulare Medizin und Medizinische Biotechnologie des Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin  
März 2007 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Zellbiologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
Diplomarbeitsthema:  
Protein „knock down“ der Profilin-Isoformen 1 & 2a in verschiedenen Zellsystemen:  
Konstruktion von miRNA-Vektoren und Funktionsanalyse  
Juni 2006 Ablegen der Diplomprüfung:  
Hauptfach Pflanzenbiologie  
Nebenfächer Zellbiologie und Genetik  
Juni 2004 Ablegen der Diplomvorprüfung:  
Zoologie, Pflanzenbiologie, Mikrobiologie, Genetik, Mathematik und Chemie  
Oktober 2002 Studium der Biologie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

### Berufliche Praxis:

2011 – heute Biotechnologin am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin  
2007 – 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Molekulare Medizin und Medizinische Biotechnologie des Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin  
2002 – 2004 Studentische Hilfskraft im Institute für Pflanzenbiologie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
1999 – 2002 Biologisch Technische Assistentin im Institute für Pflanzenbiologie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

### Schulbildung:

2002 Immaturenprüfung an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
1996 – 1999 Carl-Severing Schulen Bielefeld  
Ausbildung zur Biologisch Technischen Assistentin mit Fachhochschulreife  
1990 – 1996 Realschule Bünde-Nord  
Abschluss: Fachoberschulreife mit Berechtigung zum Besuch der gymnasialen Oberstufe  
1986 – 1990 Grundschule Stift-Quernheim

## **Veröffentlichungen:**

- Hunecke D, Spanel R, Länger F, Nam SW, Borlak J. MYC-regulated genes involved in liver cell dysplasia identified in a transgenic model of liver cancer. *J Pathol.* 2012 Dec;228(4):520-33. doi: 10.1002/path.4059. Epub 2012 Nov 6.
- Tarnow P, Tralau T, Hunecke D, Luch A. Effects of triclocarban on the transcription of estrogen, androgen and aryl hydrocarbon receptor responsive genes in human breast cancer cells. *Toxicol In Vitro.* 2013 Aug;27(5):1467-75. doi: 10.1016/j.tiv.2013.03.003. Epub 2013 Mar 21.

## **Danksagung**

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Borlak für die exzellente wissenschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit. Sowie für die Möglichkeit diese am Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin anfertigen zu können. Ihre steten Anregungen und unsere intensiven Diskussionen werden mir in Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. Jens Boch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates sowie des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ein großer Dank allen meinen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Molekulare Medizin und Medizinische Biotechnologie am Fraunhofer ITEM für das angenehme Arbeitsklima und eure Hilfsbereitschaft. Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Roman Halter für die Bereitstellung der transgenen Tiere sowie außerordentlicher Hilfsbereitschaft. Frau Dr. Susanne Reymann, Frau Dr. Dörte Solle und Frau Dr. Astrid Rohrbeck danke ich für die Unterstützung bei der Bioinformatischen Auswertung mit ArrayTrack. Insbesondere möchte ich mich auch bei allen Technischen Assistenten bedanken, die Ihre Erfahrungen an mich weitergegeben haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an Herrn Dr. Andreas Fischer richten, der mit seinen konstruktiven Anmerkungen diese Arbeit bereichert hat.

Meinen Freunden möchte ich für Ihre Unterstützung und Geduld danken.

Meinen Eltern möchte ich für die Ermöglichung meines Studiums danken, sowie für Ihre stetige Unterstützung.

Meinem Bruder und meinem Mann möchte ich für die seelische und moralische Unterstützung danken. Ich weiß, dass ich mich immer auf Euch verlassen kann.

Die Arbeit widme ich meinen wundervollen Kindern, ihr zeigt mir täglich neu das Wunder des Lebens.