

Untersuchungen zum Einfluss von Infrarot-A Strahlung auf die Genexpression in humanen dermalen Fibroblasten

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christian Calles
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2009

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf gGmbH. Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. J. Krutmann

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2009

DANKSAGUNG

Bei Prof. Dr. J. Krutmann möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir diese Arbeit am Institut für umweltmedizinische Forschung ermöglichte, bei Peet Schroeder für die super Betreuung über die ganze Zeit und der ganzen Arbeitsgruppe für das nun seit Jahren anhaltende erstklassige Arbeitsklima.

Prof. Dr. R. Wagner danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

Marc, Bianca, Fina und Tereza danke ich für Ihren Einsatz beim Korrekturlesen und Jochen für die Unterstützung in der ein oder anderen (bio)-informatischen Frage und den Tips zu \LaTeX .

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Infrarot A (IRA) und das solare Spektrum	1
1.2	Photobiologische Effekte nicht-ionisierender Strahlung	2
1.3	Aufbau & Struktur der menschlichen Haut	4
1.3.1	Die extrazelluläre Matrix (ECM) der Dermis und die Rolle von Matrixmetalloproteinasen	5
1.4	Intrinsische Hautalterung	8
1.5	Extrinsische Hautalterung durch Lichteinflüsse: Photoaging	8
1.5.1	Biologische Effekte von Infrarotstrahlung in der menschlichen Haut	9
1.6	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies in lichtinduzierten Alterungsprozessen	11
1.7	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Zellkultur primärer humaner Hautzellen	15
2.1.1	Präparation primärer humaner dermaler Fibroblasten	16
2.1.2	Medien und Lösungen für die Zellkultur	16
2.2	Strahlungsquellen und Bestrahlung von Zellkulturen	16
2.2.1	IRA-Bestrahlungsdosis	17
2.3	Behandlung von Zellkulturen mit Inhibitoren und Antioxidantien	18
2.4	Isolation der RNS	19
2.5	Microarray-Analysen mit dem Affymetrix HG-U133A Array System	19
2.5.1	Aufarbeitung der Proben, Amplifizierung und Hybridisierung auf den Microarrays	19
2.5.2	Normalisierung der Expressions-Rohdaten	20
2.5.3	Hierarchisches <i>Clustering</i>	21
2.5.4	Filterstrategie zur Identifizierung durch IRA-Bestrahlung differenziell regulierter Gene	21
2.5.5	<i>Gene Ontology Clustering</i>	22
2.5.6	<i>in silico</i> -Promotor-Analysen	22
2.6	<i>Realtime</i> -PCR	28
2.6.1	Durchführung der cDNS-Synthese und realtime-PCR	28
2.6.2	Primerdesign für die <i>realtime</i> -PCR	29
2.6.3	Primersequenzen für die <i>realtime</i> -PCR	30
2.7	Western-Blot	31
2.7.1	SDS-Gelelektrophorese	31
2.7.2	Western-Blot	31
2.7.3	Puffer und Lösungen für Western-Blot und Gelelektrophorese	33
2.7.4	Dokumentation und Quantifizierung	33

3	Ergebnisse	35
3.1	Infrarot-A-Strahlung reguliert eine Vielzahl von Genen in humanen dermalen Fibroblasten	35
3.2	Metabolismus der ECM	40
3.3	Calciumionen-Homöostase	40
3.4	Stress-Signalwege	43
3.5	Regulation der Apoptose	43
3.6	Einfluss der zellulären IRA-Antwort auf die Proteinexpression	44
3.7	Die zelluläre IRA-Antwort läuft über verschiedene Signalwege	46
3.8	Der Einfluss von ROS in der IRA-induzierten Genregulation	49
3.9	<i>in silico</i> -Promotor-Analyse der IRA-regulierten Gene	52
4	Diskussion	59
4.1	Vergleich der Reaktion von Fibroblasten verschiedener Spender auf IRA	59
4.2	Einfluss von IRA auf die extrazelluläre Matrix	59
4.3	Die Rolle von Calcium in der IRA-Antwort	59
4.4	Beteiligung der Stress-Signalwege an der zellulären Reaktion auf IRA	60
4.5	Einfluss von IRA auf die Expression von Genen der Apoptose und zugehöriger Signalwege	61
4.6	IRA-induzierte Signalwege	61
4.7	Funktionelle Relevanz von ROS in der IRA-induzierten Genregulation	61
4.8	Transkriptionsfaktoren in der IRA-Antwort	63
4.9	Übereinstimmungen zwischen IRA-regulierten Genen und beschriebenen IRA-Effekten	64
4.10	Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen IRA- und UV-bedingten Effekten	64
5	Zusammenfassung	66
6	Summary	67
7	Literatur	68
8	Abkürzungen	76
9	Anhang	80
9.1	Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen	80
9.2	Häufigkeitsverteilung der <i>predicted</i> Transkriptionsfaktor-Bindestellen	97
9.3	Funktionelles Clustering auf Basis der <i>Gene Ontology</i> -Klassifizierungen	102

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das elektromagnetische Spektrum der Sonne	2
1.2	Schematischer Aufbau der menschlichen Haut	6
1.3	Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix	7
1.4	Eindringtiefen solarer Strahlung in die menschliche Haut	11
1.5	IRA-induzierte mtROS-Bildung verändert die Genexpression.	13
2.1	Emissionsspektrum der IRA-Lampe	18
2.2	RNS-Qualitätskontrolle mittels Agilent Bioanalyzer	20
2.3	Probenamplifizierung für Affymetrix Microarrays	25
2.4	Normalisierung von Expressionsprofilen	26
2.5	Aufbau des Affymetrix HG-U133A Microarray	27
3.1	Hierarchisches <i>Clustering</i> der Expressionsprofile	36
3.2	<i>Realtime</i> -PCR ausgewählter Gene nach IRA-Bestrahlung	42
3.3	Western-Blot ausgewählter Proteine nach IRA-Bestrahlung	45
3.4	Genexpression nach IRA-Bestrahlung und Inhibitorbehandlung	48
3.5	Einfluss der Inkubation mit Antioxidantien auf die IRA-induzierte Genregulation	50
3.6	Beteiligung von ROS und Signalwegen an der IRA-Genantwort	51
3.7	Transkriptionsfaktorkandidaten der IRA-Antwort	55
4.1	Schema der IRA-induzierten Genregulation	63

Tabellenverzeichnis

2.1	Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 1	28
2.2	Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 2	28
2.3	PCR-Programm zur Synthese von cDNS	29
2.4	Pipettierschema für die <i>realtime</i> -PCR	29
2.5	PCR-Programm für die <i>realtime</i> -PCR	29
2.6	Primer Sequenzen für die <i>realtime</i> -PCR	30
2.7	Liste der für Western-Blots verwendeten Antikörper	32
3.1	Auswahl der durch IRA-Bestrahlung regulierten Gene	37
3.2	IRA-beeinflußte Prozesse und zugehörige Gene	38
3.3	Einfluss von Signalwegen auf die IRA-induzierte Genexpression.	47
3.4	IRA-spezifische Transkriptionsfaktor-Bindestellen	52
9.1	Vollständige Liste der IRA-regulierten Transkripte	80
9.2	Gesamtübersicht der Transkriptionsfaktor-Bindestellen-Häufigkeiten	97

1 Einleitung

1.1 Infrarot A (IRA) und das solare Spektrum

Die auf der Erdoberfläche eintreffende, durch die Atmosphäre gefilterte Strahlung der Sonne besteht aus den Bereichen der ultravioletten (UV) Strahlung (Wellenlänge (λ) = 290 nm – 400 nm), dem sichtbaren Licht (VIS, λ = 400 – 760 nm) und der Infrarotstrahlung (IR, λ = 760 nm – 1 mm) (Kochevar *et al.*, 2008; Endres & Fritsch, 1997). Die UV-Strahlung unterteilt sich in UVB (λ = 290 – 320 nm) und UVA (λ = 320 – 400 nm). Die IR-Strahlung umfasst drei Bereiche: Infrarot A (IRA, λ = 760 – 1440 nm), Infrarot B (IRB, λ = 1440 – 3000 nm) und Infrarot C (IRC, λ = 3000 nm – 1 mm). Die Photonenenergie der Strahlung nimmt mit steigender Wellenlänge ab, so dass UV-Strahlung wesentlich energiereicher als IR-Strahlung ist (Kochevar *et al.*, 2008). Betrachtet man jedoch die Gesamtenergiemenge, die die Erdoberfläche erreicht, zeigt sich ein anderes Bild. So besteht die Strahlenbelastung nur zu 6,8 % aus UV (0,5 % UVB, 6,3 % UVA) und zu 38,9 % aus sichtbarem Licht. Die IR-Strahlung macht dagegen einen Anteil von 54,3 % der auf der Erde auftretenden Sonnenstrahlung aus, wobei dem IRA-Wellenlängenbereich alleine ca. 30 % zukommen (Kochevar *et al.*, 2008). Die tatsächliche Dosis und Zusammensetzung der Sonnenenergie welche die Haut erreicht ist von mehreren Faktoren abhängig: Von der Ozonschicht, der Position der Sonne, dem Breiten- und Längengrad, der Bewölkung sowie der Bodenreflexion. Auf diesen Parametern basierend sei angemerkt, dass sich die Gesamtkomposition des Sonnenlichts, z.B. im Hinblick auf die UV- zu IR-Ratio, über den Tagesverlauf hin ändert. An einem Sommertag in mitteleuropäischen Breiten macht diese Gesamtenergie der Sonnenexposition auf der menschlichen Haut ca. 2400 J/cm² aus (Quelle: Landesumweltamt Baden-Württemberg), die durchschnittliche IRA-Strahlendosis an einem Julitag in München beträgt 75 J/cm² pro Stunde (Quelle: Deutscher Wetterdienst) (Schieke *et al.*, 2003).

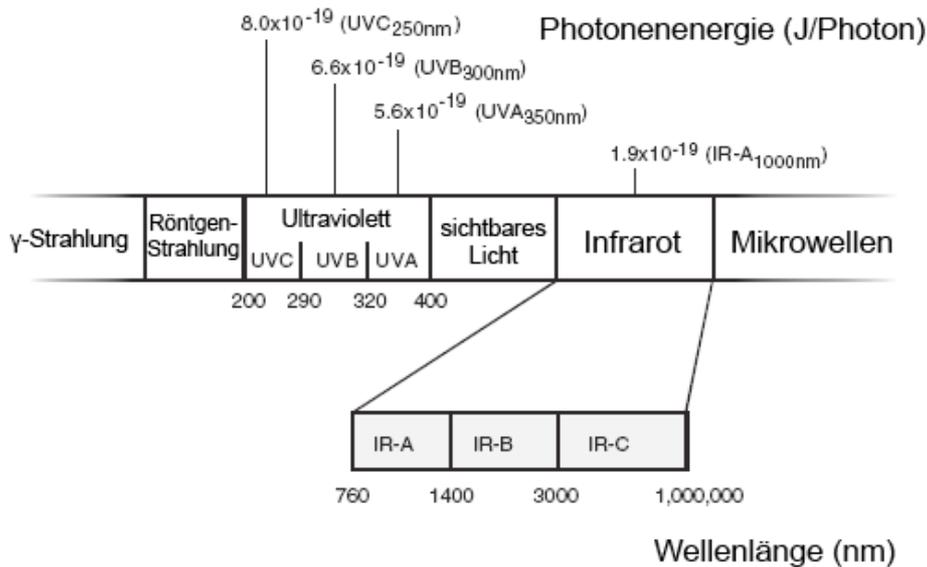


Abbildung 1.1: Das elektromagnetische Spektrum der Sonne. Abbildung verändert nach Schieke *et al.* (2003).

1.2 Photobiologische Effekte nicht-ionisierender Strahlung

Wenn Photonen der Sonnenstrahlung die Hautoberfläche erreichen, müssen eine ganze Reihe von Schritten erfolgen, damit die Strahlungsenergie in biologische Effekte transformiert wird. Zunächst muss die Strahlung bis in die entsprechende Hautschicht penetrieren, in der sie von den entsprechenden Molekülen absorbiert wird. Diese Moleküle werden als Chromophore bezeichnet. Die Chromophore gehen in einen angeregten Zustand über, indem die absorbierte Energie dazu dient, ein Elektron auf ein höheres Energieniveau zu bringen. Photochemische Reaktionen können dann die angeregten Chromophore zu Photoprodukten weiterkonvertieren. Die angeregten Chromophore oder Photoproduktmoleküle stimulieren nun zelluläre Signaltransduktionswege, die zu biochemischen Veränderungen führen, die sich zu zellulären Effekten summieren, z.B. zu Prozessen wie Proliferation, die Sekretion von Zytokinen oder die Induktion von Apoptose, welche als akute Antwort der Hautzellen beobachtet werden kann. Eine ähnliche Kaskade ist ebenfalls verantwortlich für Reaktionen auf chronische Strahlungseinwirkung, wie z.B. die Faltenbildung bei der Lichtalterung der Haut. Elektromagnetische Strahlung wird als Welle bestehend aus oszillierenden elektrischen und magnetischen Feldern angesehen, die zueinander und zur Ausbreitungsrichtung jeweils im rechten Winkel stehen. Zusätzlich zum Wellencharakter kann man die elektromagnetische Strahlung als Strom von diskreten Energiepaketen auffassen, welche man als Photonen bezeichnet. Die Energiemenge in einem Photon ist direkt proportional zur Frequenz der Strahlung und umgekehrt proportional zur Wellenlänge der Strahlung. Aufgrund der vergleichsweise geringeren Energie verursachen Photonen von

Wellenlängen größer als das sichtbare Licht in der Regel keine direkten photochemischen Reaktionen (zur Übersicht siehe Kochevar *et al.* (2008)). Wenn Sonnenstrahlung auf die Haut trifft wird ein Teil der Strahlung reemittiert (reflektiert und gestreut), ein Teil wird von Chromophoren in den verschiedenen Schichten absorbiert und ein weiterer Teil wird inwärts zu Absorptions-sensitiven Schichten weitergeleitet. Ein sehr geringer Teil der absorbierten Strahlung wird auch als Fluoreszenz mit größerer Wellenlänge reemittiert. Die Absorption und Streuung der Strahlung in der menschlichen Haut ist von Wellenlänge zu Wellenlänge verschieden (siehe auch Abb. 1.4). Nach der Absorption der Energie eines Photons tritt das Chromophor in einen angeregten Zustand. Eine solche Anregung in den sogenannten Singulett-Zustand existiert nur für wenige Nanosekunden. Das Molekül kehrt entweder durch Emittieren von Lichtenergie (Fluoreszenz) oder durch Abstrahlung von Wärme über verstärkte Molekülbewegung in den Grundzustand zurück, ein Vorgang der interne Umwandlung genannt wird. Alternativ kann der angeregte Singulettzustand auch zu einer chemischen Reaktion führen in der ein Photoprodukt gebildet wird, indem das angeregte Molekül z.B. ein Elektron abgibt und zum Radikal wird oder eine kovalente Bindung eingeht oder eine solche Bindung bricht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das Molekül aus dem Singulett-Zustand in einen anderen angeregten Zustand mit geringerem Energieniveau übergeht, den angeregten Triplettzustand. Man spricht hier vom *Intersystem-Crossing*. Die Singulett- und Triplett-Anregungszustände unterscheiden sich im Elektronenspin eines Elektronenpaares innerhalb eines Orbitals. Wenn der Spin der beiden Elektronen in einem Orbital entgegengesetzt ist, spricht man von einem Singulett Zustand, wenn der Elektronenspin bei beiden gleich ist, ist es ein Triplett-Zustand. Der Triplett-Zustand ist stabiler und kann bis zu einigen Mikrosekunden lang existieren. Der Triplett-Zustand kann wiederum Licht emittieren (Phosphoreszenz), eine chemische Reaktion eingehen oder durch *Intersystem-Crossing* in den Singulett-Grundzustand zurückkehren (Kochevar *et al.*, 2008). Eine Besonderheit ist jedoch das zunächst eher unreaktive Sauerstoffmolekül, dass im unangeregten Grundzustand zwei ungepaarte Elektronen in einem Triplett-Zustand mit parallelem Spin besitzt und erst bei Aktivierung zu einer reaktiven Sauerstoffspezies mit Singulett-Anregungszustand und antiparallelem Elektronenspin wird (Elstner, 1990). Aufgrund der geringeren Photonenenergie im Vergleich zur UV-Strahlung, wurde der IRA-Strahlung zunächst auch kein weiterer Effekt als die reine Hitzeinduktion in biologischen Systemen zugesprochen. Diese Sichtweise wird aber durch neuere Beobachtungen nach und nach erweitert. Endogene Chromophore in den Zellen, auch als *Photosensitizer* bezeichnet, wie z.B. Porphyrine, Flavine und mitochondrielle Zytochrome sind aufgrund ihrer speziellen molekularen Charakteristik in der Lage, strahlungsabsorbierte Energie auf ein nahegelegenes Molekül zu übertragen, welches sich in einem sogenannten Triplett Grundzustand befindet (Amat *et al.*, 2004). Eines der wenigen Moleküle, die diesen Grundzustand besitzen, ist der Sauerstoff. Als Resultat dieses Energietransfers von Photosensitizern hin zum Sauerstoff werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und insbesondere Superoxidradikalanion gebildet. Für diese Reaktionen scheint auch die Photonenenergie im IRA-Bereich auszureichen. Unterstützt wird diese These durch Beobachtungen, dass z.B. die Zytochrom c-Oxidase, ein ebensolches Chromophor aus der mitochondrialen Atmungskette, Strahlung im IRA-Bereich absorbiert (Karu *et al.*, 2001) und IRA-Bestrahlung zur Bildung von mitochondrialem ROS in humanen dermalen Fibroblasten führt (Schroeder *et al.*, 2007). Manche Erklärungsansätze zur Wirkung von IRA gehen jedoch noch weiter, denn zusätzlich zu der Eigenschaft von Licht, durch Absorption Moleküle in einen angeregten Zustand zu versetzen, d.h. eine Elektronenanregung zu verursachen, müssen auch die elektrischen Eigenschaften dieser

Strahlung berücksichtigt werden. Wie aus der Definition von elektromagnetischer Strahlung hervorgeht, ist ein intensiv oszillierendes elektrisches Feld mit den Photonen im sichtbaren und IR-Bereich assoziiert. Dieses Feld des IR-Strahls würde daher zu einem elektrischen Stromfluss führen, wenn freie Elektronen im Medium vorhanden sind. Dieser elektrische Stromfluss würde dann zur Absorption von Energie und der Umwandlung in Wärme führen. Die elektrische Komponente von elektromagnetischer Energie soll somit auch einen Effekt auf dipolare Moleküle besitzen wie z.B. auf Enzyme, Ionenpumpen, Zellmembranen und Organellen oder auch Nukleotide (Amat *et al.*, 2004). Daher würde sich dieser Effekt auch auf Membranpotentiale auswirken und auf diese Weise die für IRA beschriebenen Effekte auslösen können (siehe auch Kapitel 1.5.1 und 1.6).

1.3 Aufbau & Struktur der menschlichen Haut

Die Haut ist mit einer Oberfläche von bis zu 2 m² und einer Masse von bis zu 3 kg eines der größten Organe des Menschen. Sie besteht aus zwei fest miteinander verzahnten Schichten, der Oberhaut (Epidermis) und der Lederhaut (Dermis), sowie der Unterhaut (Subcutis). Die Haut kann als ein komplexes Organ betrachtet werden, welches vielfältige Funktionen zu erfüllen hat. Die wichtigste Funktion der Haut ist die sogenannte (physikalische) Barrierefunktion, also dem Schutz vor Austausch von Gas und Wasser mit der Umwelt, um Austrocknung und das Eindringen nicht körpereigener Substanzen zu kontrollieren. Auch der Schutz vor mechanischen Beanspruchungen ist eine Primäraufgabe der Haut. Epidermis und Dermis sind miteinander stark verzahnt (siehe Abbildung 1.2) was für ein hohes Maß an Resistenz gegen Dehnung sorgt. Die untereinander verwobenen Proteinstrukturen der extrazellulären Matrix (ECM) in der Dermis, hauptsächlich aufgebaut aus Kollagen und anderen Makromolekülen (siehe Kapitel 1.3.1), sorgen für die hohe Elastizität bei gleichzeitig hoher Stabilität und Belastbarkeit (Fritsch, 2004; Freedberg *et al.*, 2003). Die Haut trägt auch maßgeblich zur Thermoregulation des Körpers bei. Eingelagertes Fett in der Subcutis isoliert den Körper gegen Kälte, die in der Dermis sitzenden Schweißdrüsen dagegen ermöglichen die aktive Kühlung über Schweißabsonderung und Verdunstungskälte. Zum Schutz vor Belastungen der Sonnenstrahlung, insbesondere der energiereicheren UV-Strahlung, kann die Haut das Ausmaß ihrer Pigmentierung erhöhen. Die Melanozyten synthetisieren das im UV-Bereich absorbierende Melanin, welches dann in den Keratinozyten eingelagert wird. Ein Schutz vor Mikroorganismen stellt auch das mit einem pH-Wert von 5,5 saure aber trockene Milieu der Hornschicht dar. Abbildung 1.2 zeigt den Aufbau der Haut und ihrer verschiedenen Schichten. Vorherrschender Zelltyp in der Epidermis sind die Keratinozyten mit einem Anteil von rund 90 %. Durch Einlagerung von Keratin und anderen Filamenten sind diese Epithelzellen in der Lage, sich in Horn umzuwandeln, das von der obersten Schicht der Epidermis, der Hornhaut (dem *Stratum corneum*) als Hornschuppen abgestoßen wird. Die Zellneubildung der Keratinozyten erfolgt über Amplifikationszellen die von Stammzellen in der Epidermis gebildet werden. Bei der Zellteilung bleibt eine der beiden Tochterzellen als Stammzelle erhalten, während die andere Tochterzelle zur Amplifikationszelle wird und zum Keratinozyten differenziert, der innerhalb von etwa 30 Tagen von der Basis der Epidermis bis zur Oberfläche wandert und durch den Prozess der Verhornung letztendlich abstirbt (Campbell & Reece, 2003; Kochevar *et al.*, 2008). Die Stamm- und Amplifikationszellen sitzen in der untersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum basale* oberhalb der Basallamina, welche die stark

verzahnende Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis bildet. In das *Stratum spinosum* eingebettet finden sich weitere Zelltypen der Epidermis, die Langerhans-Zellen und die bereits erwähnten Melanozyten. Vom *Stratum basale* migrieren die Keratinozyten durch das *Stratum spinosum* und das *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum*. Der hierbei durchlaufene Differenzierungsprozess der Keratinozyten führt zur Entstehung von sogenannten Korneozyten. Korneozyten entstehen unter Abflachen in der Zellform mit Verlust von Wasser sowie dem Zellkern und der Organellen, sowie einer massiven Einlagerung von Keratinen. In biologischer Sichtweise handelt es sich um tote Zellen, die das *Stratum corneum* als äußerste Schicht der Epidermis bilden. Neben der Epidermis haftet auch die Dermis an der Basallamina. Die Keratinozyten des *Stratum basale* sind über Ankerfilamente mit der Basallamina direkt verbunden. In der Dermis dagegen besteht die Verankerung mit der Basallamina über Ankerfibrillen über die extrazelluläre Matrix. Der Hauptzelltyp der Dermis sind die Fibroblasten, die vereinzelt in einem Fasergeflecht, der extrazellulären Matrix (ECM) sitzen (siehe auch Kapitel 1.3.1) und keinen dichten Zellverband bilden. Hauptbestandteil der ECM ist das Kollagen, elastische Fasern wie das Elastin und das Fibrillin sowie Glykosaminglykane und Proteoglykane (Fritsch, 2004). Zu einem weiteren Teil besteht die Dermis auch aus Blutgefäßen, Nerven, Schweißdrüsen und den Haarwurzeln. Unterhalb der Dermis, in der Subcutis, finden sich die Fettzellen.

1.3.1 Die extrazelluläre Matrix (ECM) der Dermis und die Rolle von Matrixmetalloproteinasen

Die eng miteinander verwandten Proteine der Kollagenfamilie sind die Hauptkomponente des fibrillären Bindegewebes und die häufigsten extrazellulären Proteine des menschlichen Körpers (Kochevar *et al.*, 2008). Die physiologische Rolle der Kollagenfasern in der Haut besteht darin, ihr Zugfestigkeit zu verleihen, um so als Schutzorgan gegen externe Traumata zu dienen. Die Kollagenfasern machen ungefähr 80 % des Trockengewichtes der Dermis aus (Kochevar *et al.*, 2008). Das am häufigsten vorhandene Kollagen ist vom Typ I, bestehend aus einer Tripelhelix aus drei umeinander verwundenen α -Ketten, die sich zu parallel angelagerten Fibrillen anordnen, aus denen die Kollagen-Fasern aufgebaut sind. Zusätzliche Stabilität wird durch kovalente Verknüpfung der Kollagenfasern untereinander durch sogenannte *Cross-links* erreicht, wodurch die Kollagen-Fasern in die Lage versetzt werden, die benötigte Zugfähigkeit auszubilden. Desweiteren besteht die extrazelluläre Matrix aus elastischen Fasern, die für die Dehnbarkeit sorgen, auch wenn sie mengenäßig zum dominierenden Kollagen eher eine untergeordnete Komponente der ECM darstellen. Elastische Fasern bestehen aus zwei Komponenten: Die Hauptkomponente ist das Protein Elastin, was von mikrofibrillären Strukturen umgeben ist, die aus einer Vielzahl von Proteinen bestehen. Die größten und vielleicht auch wichtigsten mikrofibrillären Proteine sind die Fibrilline. Diese 350-kd großen Glykoproteine bilden den integralen Bestandteil der Mikrofibrillenstruktur. Weitere Proteine der Mikrofibrillen sind unter anderem die *Latent TGF- β -bindenden* Proteine, die Fibuline, die Lysyloxidasen und die Emiline. Fibronectin, ein Glykoprotein, vermittelt die Anhaftung der Fibroblastenzellen der Dermis, die ein Großteil der extrazellulären Matrix-Proteine produzieren, an das Kollagen der ECM unter Beteiligung der Integrin-Rezeptoren (Leiss *et al.*, 2008). Ein weiterer Bestandteil der extrazellulären Matrix sind die Proteoglykane mit ihrer Fähigkeit, Proteine zu binden und Protein-Protein-Wechselwirkungen oder auch Enzymaktivitäten zu verändern. Proteoglykane, aufgebaut aus einem Proteinteil und einer Disaccharidkomponente, fungieren

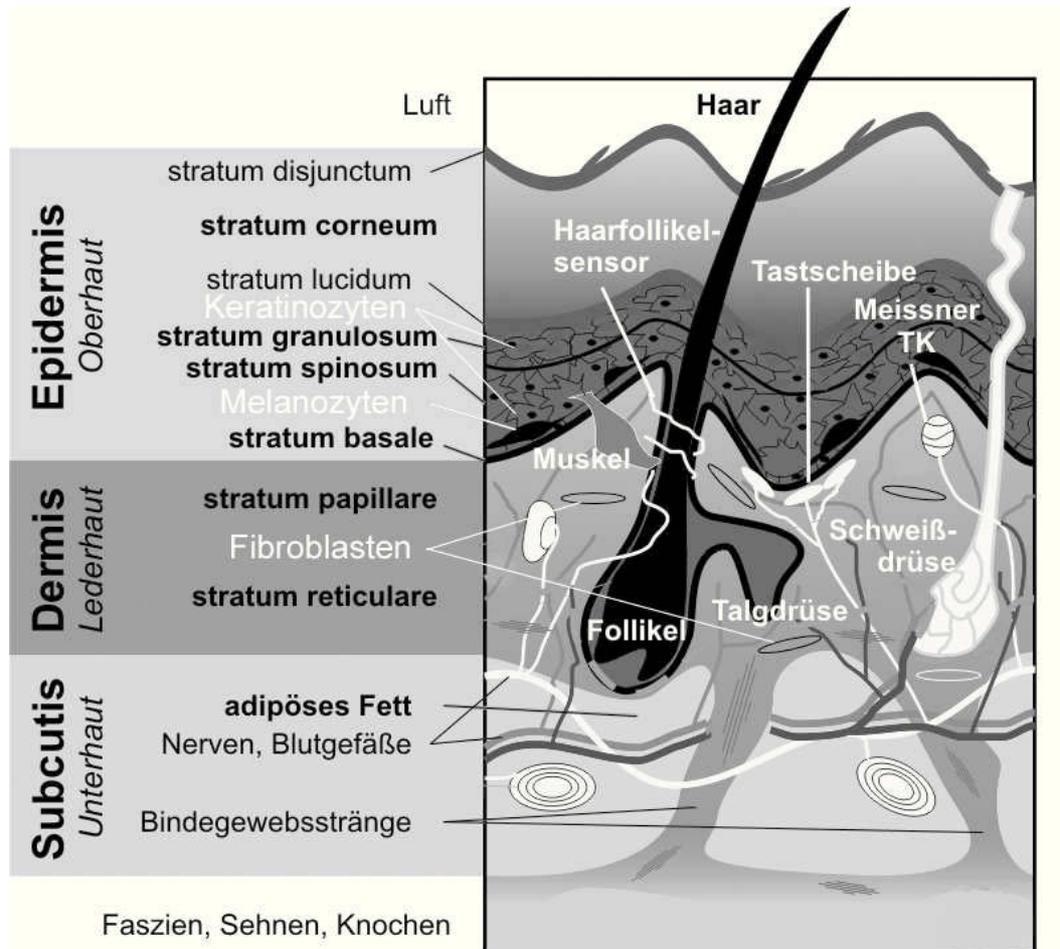


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau der menschlichen Haut. Die drei Schichten der Haut, Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis), dargestellt mit den zugehörigen Substrukturen. Abbildung verändert nach medOCT (medOCT group, 2006).

unter anderem auch als Schnittstelle zwischen der Plasmamembran der Zellen und der extrazellulären Umgebung, indem sie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Komponenten der ECM binden.

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zählen zur Familie der zinkabhängigen Metalloendopeptidasen. Man unterscheidet mehr als 20 verschiedenen MMPs. Die Hauptfunktion der MMPs besteht aus dem Ab- und Umbau der Proteine der extrazellulären Matrix. Die Fibroblasten in der Dermis exprimieren insbesondere die MMPs -1, -2, -3, -13 und -14, die jeweils unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen und in den extrazellulären Raum sezerniert werden, wo sie aus inaktiven Pro-Formen in die aktiven Varianten übergehen. Dann erfolgt der Abbau des jeweiligen Substrats, z.B. von bereits denaturiertem Kollagen durch MMP-13 (Hijova, 2005). Für das Aufrechterhalten des Kollagengleichgewichtes in der ECM ist eine strikte Regulation der sezernierten Peptidasen nötig. Dies erfolgt durch eine ebenfalls stark kontrollierte Expression der entsprechenden MMP-Inhibitoren, den sogenannten TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). TIMPs sind in der Lage, MMPs über die Bindung an diese zu inaktivieren. Bei den TIMPs handelt es sich eben-

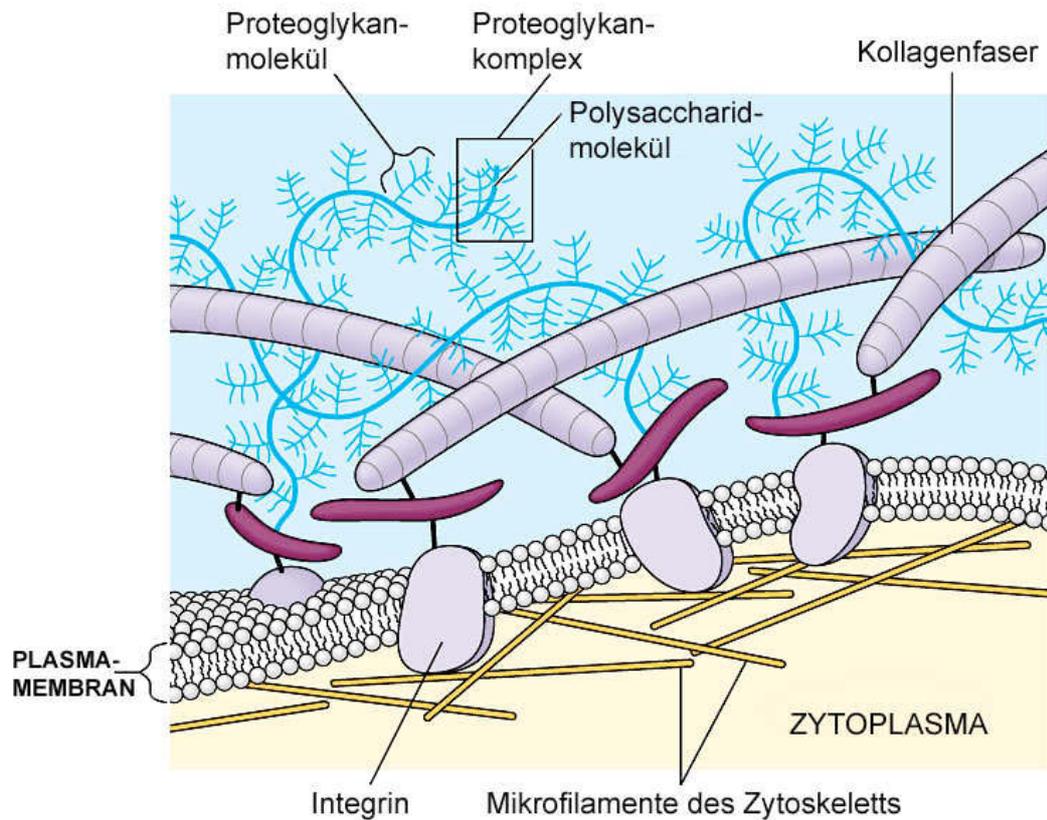


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix. Die ECM besteht in wesentlichen Teilen aus Kollagenfasern, Proteoglykanen sowie in weitaus geringeren Anteilen aus Elastizität vermittelnden Elastinen. Abbildung verändert nach Campbell & Reece (2005).

falls um eine eigene Proteinfamilie mit jeweils unterschiedlichen Bindespezifitäten für die diversen MMPs (Lambert *et al.*, 2004).

Eine besondere Rolle bei pathologischen Prozessen kommt MMP-1 zu, denn sowohl in der lichtinduzierten Hautalterung, als auch in der Tumorentwicklung kommt es zum Abbau der fibrillären Kollagene vom Typ I, II, III, VII, VIII und X durch MMP-1, das aufgrund seiner entsprechenden Substratspezifität in der Lage ist, diese wesentlichen Bestandteile der Bindegewebsstrukturen in der Dermis abzubauen (Woessner & Nagase, 2000). Die unbalancierten MMP-Aktivitäten jedoch führen zur Proteolyse der Matrixproteine, ein Prozess den man als einer der wichtigsten pathophysiologischen Faktoren in der extrinsischen Hautalterung auffasst (siehe Kapitel 1.5). Die erhöhte Expression von MMPs ohne eine gleichzeitige Erhöhung der TIMP-Expression führt zum Abbau des fibrillären Kollagens und zerstört somit das fragile Gleichgewicht der strukturellen Integrität der Dermis. In einem gewissen Ausmaß kann solch einer Schädigung der ECM mittels einer erhöhten Produktion von Kollagen selbst entgegnet werden (Brenneisen *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2002, 1997), jedoch kommt es bei der Lichtalterung der Haut auch zumeist zu einer verringerten Kollagen-Neusynthese (Buechner *et al.*, 2008). Die Konsequenz des Kollagenabbaus

aufgrund der erhöhten MMP-1-Expression bedeutet bei der Lichtalterung eine verstärkte Faltenbildung (Gilchrest & Krutmann, 2006). In der Tumorentwicklung führt dieses zu einer vereinfachten Metastasierung und zu einem verstärkten invasiven Wachstum aufgrund der Degradierung des den Tumor umgebenden Gewebes (Lemaitre & D'Armiento, 2006).

1.4 Intrinsische Hautalterung

Alterung ist ein Prozess der fortschreitenden Abnahme in der maximalen Leistungsfähigkeit und Reservekapazität aller Organe im Körper inklusive der Haut. Alterung tritt auf zellulärer Ebene auf, und setzt sich sowohl aus einem genetischen Programm als auch aus einer Anhäufung von Schäden hervorgerufen durch von aussen bedingten Einflüssen zusammen. Säugetierzellen sind nur zu einer limitierten Anzahl von Zellteilungen in der Lage und arrestieren danach unwiederbringlich in einem Zustand der als replikative Seneszenz bekannt ist. Diese Tatsache hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass sich Alterung in multizellulären Organismen als ein Protektionsmechanismus gegen Krebs entwickelt hat, denn sie verhindert das unlimitierte und vermutlich unregulierte Wachstum von Zellen, deren DNS über ihre Lebenszeit fortwährend geschädigt wurde. Die Alterungsprozesse, die unabhängig von äusseren Einflüssen ablaufen, bezeichnet man als intrinsische, chronologische Alterung. In der menschlichen Haut führt die intrinsische Alterung zu funktionellen Verlusten. Es kommt zu einem flacher ausfallenden Grad der Verzahnung der dermal-/epidermalen Verbindungsschicht, einer Abnahme der Zellzahlen sowie der Dicke und des Volumens der Haut. Intrinsisch gealterte Haut ist rauer und trockener, schlaffer und unelastischer, zeigt eine erniedrigte Vaskularisierung und erholt sich schlechter von Verletzungen. Es kommt zu alterungsbedingtem Verlust der elastischen Fasern und des dermalen Kollagens. Dies resultiert in der Ausbildung eines feinen Faltenmusters. Auch die intrinsische Hautalterung führt zur Ausbildung eines feinen Faltenmusters durch den altersbedingten Verlust der elastischen Fasern und des dermalen Kollagens, jedoch unterscheiden sich diese feinen Falten deutlich von denen die durch Lichtalterung der Haut entstehen, wo das makroskopische Bild eine wesentlich stärkere Ausbildung weitaus groberer Falten und tiefer Furchen zeigt (Yaar, 2006).

Eine der maßgeblichen Theorien des Alterns sagt aus, dass eine Anhäufung von Schäden an den Biomolekülen inklusive der DNS auftritt, die mit der Zeit immer schlechter repariert und behoben werden können. Diese akkumulierenden Schäden sind das Resultat von freien Radikalen und auch die Haut ist über den aeroben Metabolismus kontinuierlich dem oxidativen Stress der hierbei gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt.

1.5 Extrinsische Hautalterung durch Lichteinflüsse: Photoaging

Lichtalterung der Haut (Photoaging) äußert sich durch eine Störung der Barrierefunktion, Pigmentierungsänderungen, ein Nachlassen der Hautelastizität und eine gesteigerte Faltenbildung. Diese Symptome werden unter anderem durch Degradation des Kollagens der extrazellulären Matrix ausgelöst. Die molekularen Mechanismen der Matrix-Degradation

sind in Kapitel 1.3.1 beschrieben. Die vorzeitig auftretende Alterung der Haut durch Umwelteinflüsse bekommt im Hintergrund des veränderten Freizeitverhaltens in der westlichen Welt und der demographischen Entwicklung hin zu einer immer längeren Lebensspanne eine zunehmende gesundheits- und gesellschaftspolitische Bedeutung.

Es konnte vielfach gezeigt werden, dass die chronisch erhöhte Expression von MMP-1, hauptverantwortlich für die Faltenbildung in der lichtgealterten Haut, durch verschiedene Wellenlängenbereiche des Sonnenlichts hervorgerufen wird. So ist UVA-Strahlung in humanen Fibroblasten in der Lage, die Expression von MMP-1 zu erhöhen (Wlaschek *et al.*, 1994), wobei die UVA-induzierte Bildung von ROS als Auslöser dieses Prozesses postuliert wird (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993). Die Rolle von ROS in lichtinduzierten Alterungsprozessen wird weiter in Kapitel 1.6 beschrieben. Auch UVB-Strahlung ist in der Lage die Expression von MMP-1 in Hautzellen zu induzieren. Girolamo *et al.* konnten diesen Mechanismus in der Hornhaut des menschlichen Auges nachweisen (Girolamo *et al.*, 2005). Auch Proteine sind vom oxidativen Schaden beeinflusst. Lichtgealterte Haut zeigt eine Anhäufung von oxidierten, geschädigten Proteinen in den oberen Bereichen der Dermis (Kochevar *et al.*, 2008). Kontinuierlich erhöhte Produktion von ROS schädigt auch die mitochondriale DNS (mtDNS). Lichtgeschädigte Haut zeigt eine höhere Mutationshäufigkeit als sonnengeschützte Haut auf und es kommt zu einer Akkumulierung von großen mtDNS Deletionen (Reimann *et al.*, 2008; Trifunovic *et al.*, 2004).

Die Absorption der Sonnenstrahlung in der menschlichen Haut verläuft nicht linear zum Energiegehalt der Photonen entsprechender Wellenlänge. In gesunder Haut penetriert nur ein sehr geringer Anteil von UVB in tiefere Hautschichten als die Epidermis. UVA hingegen erreicht die Dermis in grösserem Ausmaß, doch IRA wiederum dringt sogar bis in das subkutane Gewebe ein. Ungefähr 50% der IRA Strahlung, die auf die Haut auftrifft, wird in der Dermis absorbiert.

1.5.1 Biologische Effekte von Infrarotstrahlung in der menschlichen Haut

Über die Bedeutung von Infrarotstrahlung in Bezug zur vorzeitigen Hautalterung wurde bereits vor über 20 Jahren diskutiert. Kligman (1982) war die Erste, die zeigen konnte, dass UV-induzierte Hautschädigung in Meerschweinchen durch IR-Strahlung noch weiter verstärkt werden konnte, was dazu führte, dass sie auch den Effekt von IR alleine beobachtete. In ihren Untersuchungen führte IR zu Elastose, wobei IR zur Produktion von vielen feinen, federartigen Fasern und einem starken Anstieg der aus Glykoproteinen bestehenden gelartigen Grundsubstanz in der Dermis führte, Beobachtungen die man auch beim Menschen in aktinisch geschädigter Haut macht. Hieraus schlussfolgerte sie, dass IR zur Lichtalterung der Haut beiträgt. Von diesen Beobachtungen dauerte es 20 Jahre, bis der erste Einblick in den zugrunde liegenden Mechanismus der IR-induzierten Hautschädigung gewonnen werden konnte. Schieke *et al.* (2002) zeigten, dass geringe, physiologisch relevante Dosen von IRA zu einer Induktion von MMP-1 in humanen dermalen Fibroblasten *in vitro* führten. Aktuelle *in vivo* Studien haben nun bestätigt, dass IRA-Bestrahlung zur Aufregulation der MMP-1-Expression in der menschlichen Haut führt (Schroeder *et al.*, 2008b). Es wurde gezeigt, dass Bestrahlung mit physiologisch relevanten Dosen von wassergefiltertem IRA zur Aufregulation von MMP-1 auf mRNA- und Protein-Ebene in bestrahlten Hautarealen im Vergleich zu unbestrahlter Haut aus den selben Indivi-

1 Einleitung

duen führt (Schroeder *et al.*, 2008b). Der durch IRA-induzierte Signalweg, der für die Induktion von MMP-1 verantwortlich ist, läuft unter Aktivierung der mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPKinasen) ab. Die Aktivierung dieser Kinasen erfolgt ebenfalls in der UVA- und UVB-induzierten Signaltransduktion. Bei den MAPKinasen handelt es sich um eine Familie von Proteinkinasen, die in der Signaltransduktion eukaryotischer Zellen eine zentrale Rolle spielen. Diese Kinasen leiten ein durch eine extrazelluläre Noxe ausgelöstes Signal durch Phosphorylierung weiterer Proteine vom betreffenden Rezeptor zu den Transkriptionsfaktoren weiter (zur Übersicht: Seger & Krebs (1995)). Hierfür sind die MAPKinasen im Allgemeinen zu sogenannten MAPKinasekaskaden in Reihe geschaltet. Ausgangspunkt ist meist eine rezeptorabhängige GTPase (z.B. Ras), welche sogenannte MAPKKKs (MAPKinasekinasekinasen) (z.B. Raf) aktiviert. Diese MAPKKKs aktivieren dann wiederum MAPKKs (MAPKinasekinasen) (z.B. MEK1). Die durch MAPKKs aktivierten MAPKs können verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche dann letztendlich im Zellkern an die DNS binden können und zur Genregulation beitragen. Drei voneinander verschiedene MAPK-Signalwege wurden charakterisiert: ERK1/2 (durch extrazelluläres Signal regulierte Kinasen 1 + 2), p38 und JNK1/2/3 (c-Jun NH₂-terminale Kinasen 1, 2 + 3). Diese drei Kinasen werden alle durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosin-Resten ihres Threonin-X-Tyrosin-Motivs im sogenannten Aktivierungs-Loop aktiviert. ERK1/2, die JNKs und p38 sind an der Regulation von globalen zentralen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Proproliferative Signale, z.B. die Bindung von EGF (Epidermal Growth Factor) an den EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), führen zu einer Aktivierung von ERK1/2 (Seger & Krebs, 1995). ERK1/2 wird auch als eine Stresskinase bezeichnet, da sie insbesondere bei zellulärem Stress wie z.B. bei gesteigerten Mengen von ROS aktiviert wird. Erhöhte zelluläre ROS-Mengen wurden als direkte Folge von UVA-Strahlung nachgewiesen und sind so in der Lage MAPKinasen zu aktivieren (Grether-Beck *et al.*, 1997). Mittels der Aktivierung von ein und denselben MAPKinasen können eine Vielzahl auch gegensätzlicher Prozesse wie die Proliferation der Zellen oder die Reaktion auf exogenen Stress induziert werden. Die Spezifität der Signaltransduktion für einen bestimmten Reiz ergibt sich erst durch das Zusammenspiel der MAPKinasen und weiterer zellulärer Signalwege. MAPKinasen können von Phosphatasen durch Dephosphorylierung deaktiviert werden (Ellinger-Ziegelbauer *et al.* (1997), zur Übersicht: Neel & Tonks (1997)). Mittels dieses Mechanismus ist die Phosphorylierung der MAPKinasen ein reversibler Prozess, der eine schnelle Anpassung des Signalflusses ermöglicht. Schieke *et al.* (2002) konnten zeigen, dass ERK1/2 und p38 durch IRA-Bestrahlung in dermalen Fibroblasten aktiviert werden und eine Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung dem IRA-induzierten Anstieg der MMP-1-Expression entgegensteht. Obwohl der Fokus der bisherigen Untersuchungen der molekularen Effekte von IRA auf der Expression und Regulation von MMP-1 gelegen hat, legt die Beteiligung der MAPK-Aktivierung nahe, dass auch die Regulation weiterer Gene betroffen ist. Zusätzlich zum Einfluss von IRA auf MMP-1, sind einige weitere zelluläre und physiologische Antworten auf IRA-Bestrahlung bekannt. Kim *et al.* (2006) zeigten, dass IRA an der Regulation der Neoangiogenese in der menschlichen Haut beteiligt ist, denn IRA verändert die Balance zwischen dem angiogenen Induktor VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) und dem angiogenem Inhibitor TSP-2 (Kim *et al.*, 2006). Interessanterweise ist eine erhöhte Neoangiogenese ebenfalls eine prominente Eigenschaft lichtgealterter Haut (Yaar, 2006). Es wurde weiterhin gezeigt, dass IRA zu einer Abnahme an epidermaler Proliferation, verringerter Dichte an Langerhans Zellen und Kontakt-Überempfindlichkeitsreaktion in Mäusen führt (Danno & Sugie, 1996).

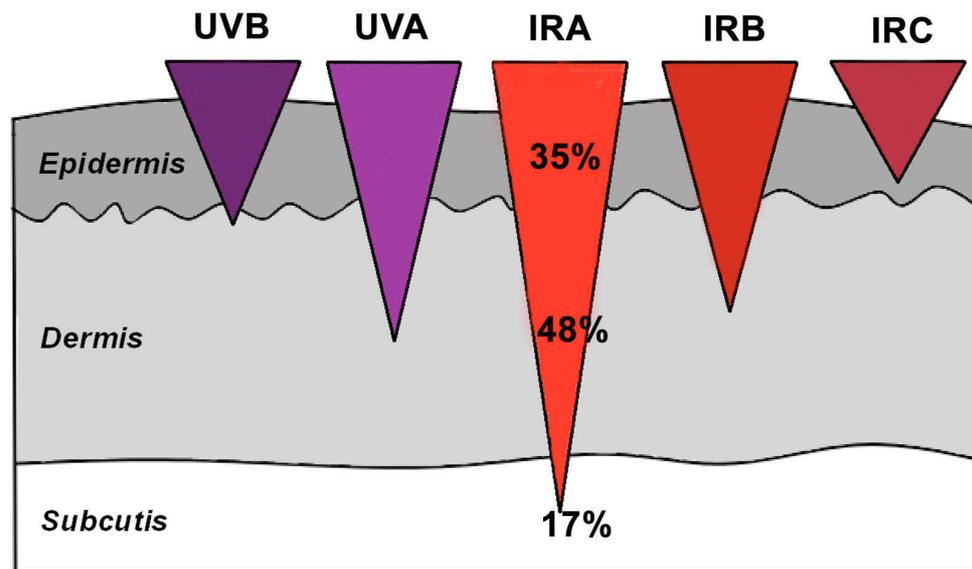


Abbildung 1.4: Eindringtiefen solarer Strahlung in die menschliche Haut. Die Eindringtiefen verschiedener Strahlungsbereiche sind in Abhängigkeit der unterschiedlichen Absorption in den verschiedenen Hautschichten sehr heterogen. IRA besitzt die grösste Eindringtiefe. Abbildung verändert nach Krutmann & Gilchrest (2006).

Eine weitere Arbeit derselben Gruppe deutet daraufhin, dass IRA auch die Wundheilung über Änderung der Level von TGF- β 1 (Transforming Growth Factor beta 1) und MMP2 (Danno *et al.*, 2001) beeinflusst. Darüberhinaus gibt es eine Arbeit, die über eine erhöhte Expression an Ferritin auf Proteinebene berichtet (Applegate *et al.*, 2000). Die Aktivierung dieses Verteidigungssystems in der menschlichen Haut spiegelt vermutlich die zelluläre Antwort auf die oxidativen Prozesse wieder, die durch IRA induziert werden (siehe auch Kapitel 1.6). Frank *et al.* (2004) beobachteten, dass IRA apoptotische Signalwege beeinflusst, insbesondere den mitochondrialen Weg der Apoptose (Frank *et al.*, 2004) unter Beeinflussung von p53 durch IRA (Frank *et al.*, 2006).

1.6 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies in lichtinduzierten Alterungsprozessen

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind, wie im oberen Abschnitt bereits erwähnt, Auslöser von Signaltransduktion über den MAPK Weg. Mehrere Studien zeigten, dass ROS zu einer Inaktivierung der Protein-Tyrosin Phosphatasen (PTPs) führt, indem der konservierte Cysteinrest im aktiven Zentrum der PTPs oxidiert wird und somit in Folge zu einer Erhöhung der Phosphorylierung/Aktivierung der Kinasen führt (Chiarugi, 2005).

In aktuellen Studien konnte nun gezeigt werden, dass in den dermalen Fibroblasten ROS durch IRA-Bestrahlung gebildet werden und diese die IRA-induzierte MMP-

1 Einleitung

1-Aufregulation vermitteln (Schroeder *et al.*, 2007). Nach IRA-Bestrahlung stieg der zelluläre ROS-Spiegel an und es trat eine Störung des zellulären Glutathion-(GSH) Gleichgewichts auf. GSH kann vor oxidativem Schaden schützen oder diesen reparieren und als Konsequenz daraus selbst oxidiert werden, wobei es Glutathion-Dimere (GS-SG) bildet. IRA-Bestrahlung führt zu einer signifikanten Verschiebung des GSH/GSSG-Gleichgewichts hin zur oxidierten Form (Schroeder *et al.*, 2007). Die IRA-induzierte ROS-Produktion ist auch von funktioneller Relevanz, denn Schroeder *et al.* (2007) zeigten auch, dass durch Steigerung des zellulären GSH-Gehaltes über die Supplementierung der Zellen mit N-Acetylcystein (NAC) die IRA-induzierte Aufregulation von MMP-1 abgeschwächt werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass in den Mitochondrien gebildete ROS das initiale Ereignis nach IRA-Bestrahlung sind und zur erhöhten Transkription und Translation des MMP-1-Gens über die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 führt (Schieke *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2007). Der Einfluss von IRA auf die Mitochondrien wurde durch die Beobachtung untermauert, dass IRA von Komponenten der mitochondrialen Atmungskette absorbiert wird (Karu *et al.*, 2001). Dieses könnte zu einer Störung des mitochondrialen Elektronenflusses führen, für die bekannt ist, dass sie zu einer erhöhten Produktion von mitochondrialem ROS führt. Solch eine Störung der mitochondrialen Funktion kann wiederum sogenannte retrograde Signalprozesse auslösen, die die nukleäre Genexpression steuern (Butow & Avadhani, 2004). Das Auslösen einer solchen Signalantwort vom Mitochondrium zum Nukleus unterscheidet sich die IRA-Antwort deutlich von denen andere Noxen einschließlich UVA und UVB. Die spezifische Rolle von mitochondrialen ROS im zellulären Redox-Signalfluss und in retrograden mitochondrialen Signalwegen wird durch neue Hinweise unterstrichen. Es erscheint nun heute so, dass ROS nicht nur Schaden-verursachende Nebenprodukte der Atmung sind, sondern auch ein wichtiger Faktor in der zellulären Signaltransduktion, insbesondere im retrograden mitochondrialen Signalfluss (Karu, 2008). Die primäre reaktive Sauerstoffspezies, welche in den Mitochondrien gebildet wird, ist das Superoxidradikalanion, welches zu H_2O_2 umgewandelt wird, entweder durch spontane Dismutation oder von der Enzymfamilie der Superoxiddismutasen (SOD) (Liochev & Fridovich, 2007). Das Mitochondrium spielt eine wichtige Rolle in der Calcium-Speicherung und der Ca^{2+} -Homöostase. Diese Organellen können das in ihnen gespeicherte Ca^{2+} freisetzen, um die lokale Konzentration in subzellulären Regionen zu erhöhen und somit verschiedene Prozesse wie mitochondrielle Proliferation und mitochondrielle retrograde Regulation als Antwort auf verstärkte ROS-Akkumulation auszulösen (Camello-Almaraz *et al.*, 2006). Veränderungen im Calciumtransport nach Laserbestrahlung im IRA-Bereich wurde bereits für Spermienzellen beschrieben (Lubart *et al.*, 1997). Somit kann man von einem multifaktoriellen *Cross-Talk* zwischen Calciumionen, dem mitochondrialen Membranpotential und ROS mit den Mitochondrien in zentraler Position für die zelluläre IRA-Antwort ausgehen (Karu, 2008).

Tatsächlich ist die Induktion der mitochondrialen ROS-Bildung hochspezifisch im Vergleich zur UV-Strahlung: Die von UVA und UVB induzierte Expression von MMP-1 wird weder von der Verwendung von Antioxidantien beeinflusst, die sich spezifisch in den Mitochondrien anreichern (MitoQ), noch durch Veränderung der Funktionalität oder der Masse der Komponenten der mitochondrialen Atmungskette. Währenddessen wird die IRA-Antwort durch all diese beschriebenen Strategien substantiell verändert (Schroeder *et al.*, 2007). Kürzliche Fortschritte im Verständnis der UVA-Antwort unterstützen diese Beobachtungen, da hier die Elektronentransportsysteme der Plasmamembran anstelle der mitochondrialen Atmungskette als essentiell für die UVA induzierte ROS-Bildung identi-

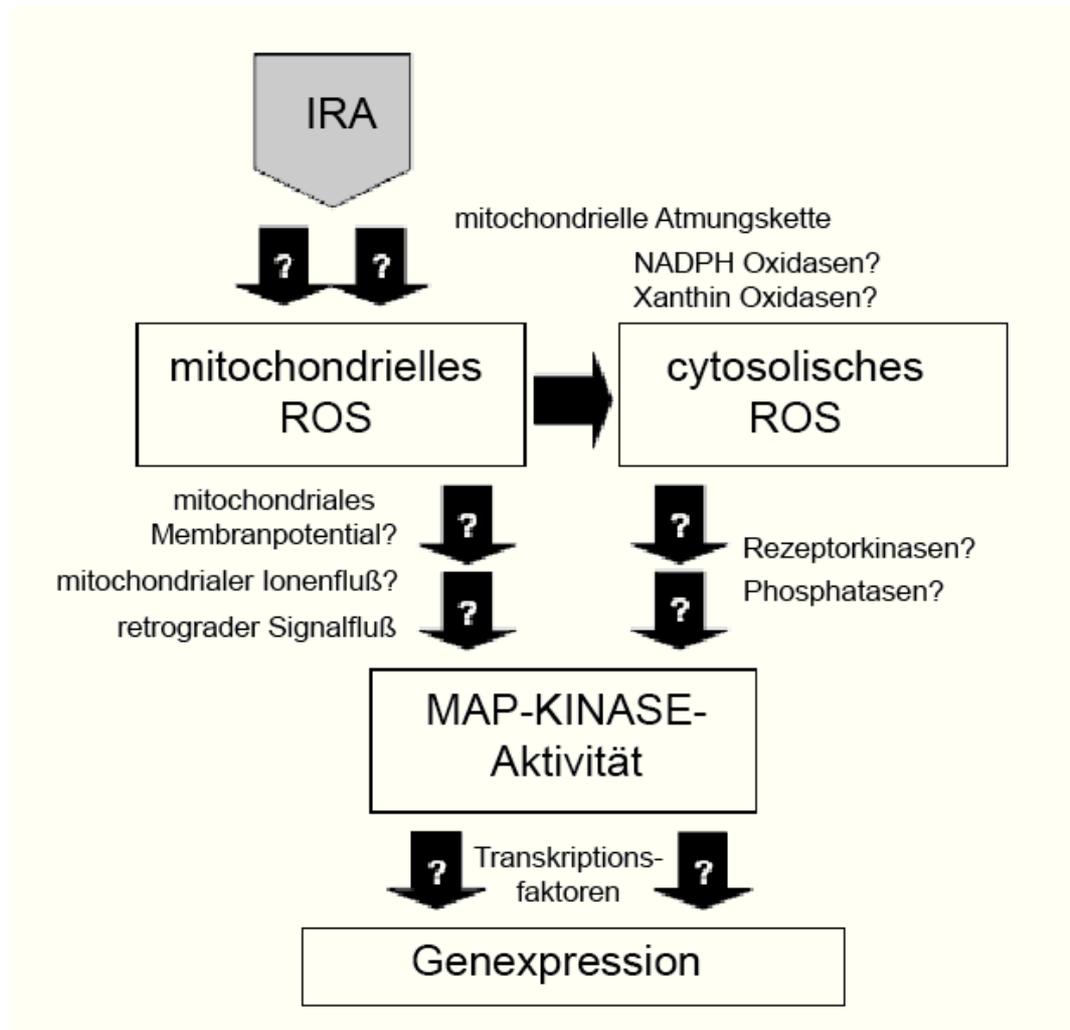


Abbildung 1.5: IRA-induzierte mtROS-Bildung verändert die Genexpression. Die IRA-induzierte Bildung von mitochondrialem ROS führt zur Veränderung der Genexpression. Mögliche Mechanismen der Signaltransduktion Abbildung verändert und erweitert nach Schroeder *et al.* (2008a).

fiziert wurden (Schauen *et al.*, 2007). Obwohl Schieke *et al.* (2002) zeigen konnte, dass ein deutlicher Unterschied in der Induktion von MMP-1 zwischen IRA-Bestrahlung und einer milden Hitzeschockbehandlung (42 °C) in dermalen Fibroblasten besteht, berichteten Shin *et al.* (2008), dass die Kultivierung von HaCat Zellen bei 44 °C zu einer erhöhten MMP-1- und MMP-9 Expression führte. Sie beobachteten weiterhin, dass neben der mitochondrialen Atmungskette Enzyme wie die NADPH-Oxidase und Xanthin-Oxidase diesen Hitzeschock-vermittelten Effekt modulieren.

1.7 Fragestellung

Die menschliche Haut ist, wenn sie dem natürlichen Sonnenlicht ausgesetzt ist, neben der UV-Strahlung und dem sichtbaren Bereich in einem großen Maße auch der Infrarot-A-Strahlung ausgesetzt, die vor allen Dingen in der Dermis absorbiert wird. Verschiedene Effekte für IRA wurden beschrieben: neben einigen vorteilhaften, therapeutischen Ansätzen (Horwitz *et al.*, 1999; Danno *et al.*, 2001) zeigen mehrere Berichte einen schädlichen Einfluss von IRA insbesondere in Bezug auf die Haut (Schroeder *et al.*, 2008a; Schieke *et al.*, 2003; Zastrow *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005). Ein besonderes Gewicht hat hierbei die IRA-induzierte Störung des dermalen Kollagen-Equilibriums, durch die Aufregulation der Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) (Schroeder *et al.*, 2007, 2008b; Kim *et al.*, 2006) und Abregulation des Kollagens ColI α 1 (Buechner *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2007, 2008b). Mechanistisch gesehen wurde diskutiert, dass das Mitochondrium den Photoakzeptor für IRA beherbergt (Karu *et al.*, 2001, 2004; Karu, 2008) und es konnte kürzlich gezeigt werden, dass IRA die mitochondrielle Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Abhängigkeit von der mitochondrialen Atmungskette stimuliert. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass es sich bei IRA um eine potente Noxe handelt, die die Haut beeinträchtigt und dass sich die Wirkungsweise und der Mechanismus deutlich von UVA und UVB unterscheidet (Krutmann & Schroeder, 2009). Diese Resultate in Verbindung mit den Beobachtungen von weiteren Arbeitsgruppen führten zu der Hypothese, dass der Einfluss von IRA auf die Genexpression weit über die bisher beschriebenen Zielgene hinausgeht. Das Ziel dieser Arbeit war es, weitere Ziele der IRA-induzierten Genregulation aufzufindig zu machen und weitere Einblicke in die involvierten Signaltransduktionswege zu erhalten, die in der zellulären Antwort auf diesen wichtigen Teil des Sonnenspektrums beteiligt sind. Dieses Ziel wurde verfolgt mit dem Einsatz von RNS-Microarrays und anschließender bioinformatischer Analyse. Die hieraus hervorgehenden primären Resultate konnten mit Hilfe von zusätzlichen, unabhängigen biochemischen und molekularbiologischen Techniken bestätigt werden. Als Modellsystem für diese Untersuchungen dienen primäre humane dermale Fibroblasten verschiedener Spender.

2 Material und Methoden

Sämtliche verwendeten Chemikalien entsprechen, sofern nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad „pro Analysis“. Für alle Lösungen wurde mit einer hauseigenen Anlage hergestelltes deionisiertes Wasser verwendet. Die Entsalzungsanlage der Firma Millipore liefert Wasser mit einer Leitfähigkeit von ca. $0,1 \mu\text{S}$. Im Folgenden wird dieses Wasser als $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ bezeichnet.

2.1 Zellkultur primärer humaner Hautzellen

Das Ausgangsmaterial für die Präparation von primären Hautzellen sind Vorhäute von 5- bis 15-Jährigen, die bei Zirkumzision anfallen. Diese Vorhäute wurden nach der Operation in Medium für die Keratinozytenkultur bei 4°C gelagert, da aus den Vorhäuten ebenfalls Keratinozytenzellen gewonnen werden, die jedoch nicht Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen sind. Die Präparation der Zellen erfolgte innerhalb weniger Tage nach Entnahme der Vorhaut.

Alle Zellkulturarbeiten und die Präparation von primären Zellen wurden unter Sterilwerkbänken durchgeführt. Die Kultivierung aller Zelltypen erfolgte in Inkubatoren von Typ HeraCell der Firma Heraeus bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$. Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturflaschen und -Schalen (unbeschichtet) stammten von der Firma Greiner-bio-one und wurden je nach Versuch in unterschiedlichen Größen eingesetzt. Experimente mit primären dermalen Fibroblasten wurden bis zur Passage 10 durchgeführt. Für die *in vitro* Experimente wurden Fibroblasten von drei verschiedenen Spendern verwendet, die im folgenden als F1, F2 und F3 bezeichnet werden.

Zentrifugationen zum Pelletieren von Zellsuspensionen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei RT für 5 min bei 1200 rpm (Heraeus Megafuge 3.0R mit Schwenkrotor) in sterilen Einweggefäßen.

Um primäre Zellen über lange Zeiträume zu lagern, wurden Aliquots früher Passagen hergestellt. Dafür wurden die Zellen einer konfluenten Zellkulturflasche mit 175cm^2 Grundfläche nach dem Ablösen mit Trypsin und Waschen mit PBS in $1,5 \text{ml}$ Einfriermedium (siehe Abschnitt 2.1.2) resuspendiert und zunächst für 24 h in einer Kryobox mit Isopropanolfüllung bei -80°C gelagert. Nach diesem langsamen Einfrierprozess erfolgt die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff. Auf diese Weise gelagerte Aliquots (je $1,5 \text{ml}$ in geeignetem Gefäß, z.B. CryoTube, Nunc) können über mehrere Jahre gelagert und mit ca. 35ml Medium wieder in eine Kulturflasche von 175cm^2 Grundfläche gesät werden.

2.1.1 Präparation primärer humaner dermaler Fibroblasten

Um das Risiko von Kontaminationen zu verringern werden zu präparierende Vorhäute zunächst für 2 min vollständig mit Gentamycin-PBS bedeckt. Die Präparation primärer humaner dermaler Fibroblasten beginnt mit der Entfernung des Unterhautfettgewebes der Vorhaut. Der verbleibende Rest wird in Stücke von ca. 2x2mm geschnitten. Etwa 10 bis 15 solcher Stücke werden mit der Seite der Dermis nach unten in eine 100 mm Kulturschale gelegt. Ohne Schalendeckel trocknen die Ränder der Hautstücke nach 10 bis 15 min am Boden der Schale fest, so dass sie beim Bedecken mit 15 ml Medium nicht aufschwimmen. Nach ca. 1 bis 2 Wochen beginnen die Fibroblasten an den Rändern der Dermis auszuwachsen. Die Hautstücke können nun entfernt werden und die verbleibenden Fibroblasten weiter kultiviert werden.

2.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Als Medium für die Kultur von primären humanen dermalen Fibroblasten wurde verwendet:

- EARLE'S MEM (1x), PAA Laboratories GmbH
- 10 % FCS (Foetal Bovine Serum), GIBCO - Invitrogen GmbH
- 1 % L-Glutamine 200 mM (100x), GIBCO - Invitrogen GmbH
- 1 % Antibiotic-Antimycotic, Penicillin G 10000 units/ml, Streptomycin 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Amphotericin B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, GIBCO - Invitrogen GmbH

Für die Kultur von Fibroblasten unter wachstumsfaktorfreien Bedingungen wurde das Medium ohne den Zusatz von 10 % FCS eingesetzt.

Die Einfriermedien zur Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff enthalten 50 % des jeweiligen Mediums, 25 % FCS und 25 % Glycerin.

Weitere Lösungen und Reagenzien:

- PBS-Puffer, D-PBS frei von CaCl_2 und MgCl_2 , GIBCO - Invitrogen GmbH
- Trypsin-EDTA (1x) in HBSS, GIBCO - Invitrogen GmbH
- Dispase-PBS, 0,2 mg/ml Dispase, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin, in PBS
- Gentamycin-PBS, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin in PBS

2.2 Strahlungsquellen und Bestrahlung von Zellkulturen

Als IRA-Strahlungsquelle wurden wassergefilterte IRA-Lampen, Modell 500 H der Firma (Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim, Germany) verwendet. Das Emissionsspektrum dieser Lampe ist in Abb. 2.1 dargestellt.

Die für Bestrahlungsexperimente eingesetzten Zellen befanden sich alle zwischen den Passagen 5 und 10 und wurden vor einer Behandlung zu 100% Konfluenz kultiviert.

Wenigstens 24 Stunden vor einer IRA-Bestrahlung wurde das Medium gegen Serum-freies MEM gewechselt, da die im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren die selben Signaltransduktionswege beeinflussen können, die in der zellulären Antwort auf die Infrarotbestrahlung beteiligt sind.

Alle Bestrahlungen von Zellen wurden nicht in Medium sondern in PBS durchgeführt. Dies ist erforderlich, da die Bestrahlung im Zellkulturmedium zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, welche die durch die Bestrahlung ausgelösten Signaltransduktionsprozesse beeinflussen können (Mahns *et al.*, 2003).

Zu Beginn einer IRA-Bestrahlung sind alle Zellen mit dem für die eingesetzte Kulturschale geeigneten Volumen PBS bedeckt. Für die 60 mm Schalen sind dies 5 ml PBS, für die 100 mm Kulturschalen 10 ml. Im Verlauf der IRA-Bestrahlung erwärmt sich die Lösung in der Kulturschale, und um diese konstant bei 37°C zu halten, wurden die Schalen zur Bestrahlung auf eine wassergekühlte Thermoplatte (Oehmen Laborbedarf, Essen) gestellt, die an ein temperierbares Wasserbad (Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Germany) angeschlossen war. Desweiteren wurde zu jeder bestrahlten Probe eine zum Schein bestrahlte Kontrolle (bezeichnet als sham) unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen mitgeführt. Diese Kontrollen werden im weiteren als sham bezeichnet. Die sham-Proben wurden für den Bestrahlungszeitraum der Probe ebenfalls mit dem entsprechenden Volumen PBS überschichtet und anstatt unter den IRA-Strahler lichtgeschützt auf einer Wärmeplatte der Firma bei 37°C gestellt. Weiterhin wurden alle Bestrahlungen ohne Deckel der Kulturschalen, also unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Bestrahlung wurde das PBS wieder abgesaugt und die Zellen entsprechend der jeweilig gewünschten Postinkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ in Serum-freiem MEM-Medium kultiviert.

2.2.1 IRA-Bestrahlungsdosis

Die Kontrolle der Strahlungsdosis erfolgte mit Hilfe eines IRA-Dosimeters Modell HBM1 der Firma Hydrosun Medizintechnik (Müllheim, Deutschland). Nach Bestimmung der Momentanleistung pro Fläche in mW/cm² für die jeweilige IRA-Lampe in den Abständen 20 und 40 cm wurde über die Dauer der Bestrahlung die Gesamt-Bestrahlungsenergie bestimmt. Mit folgender IRA-Dosis wurden die Bestrahlungen durchgeführt:

- 860 J/cm², entsprechend einer Bestrahlungszeit von 40 min bei 20 cm Abstand zum IRA-Strahler für die *in vitro*-Experimente mit den humanen dermalen Fibroblasten in Zellkultur.

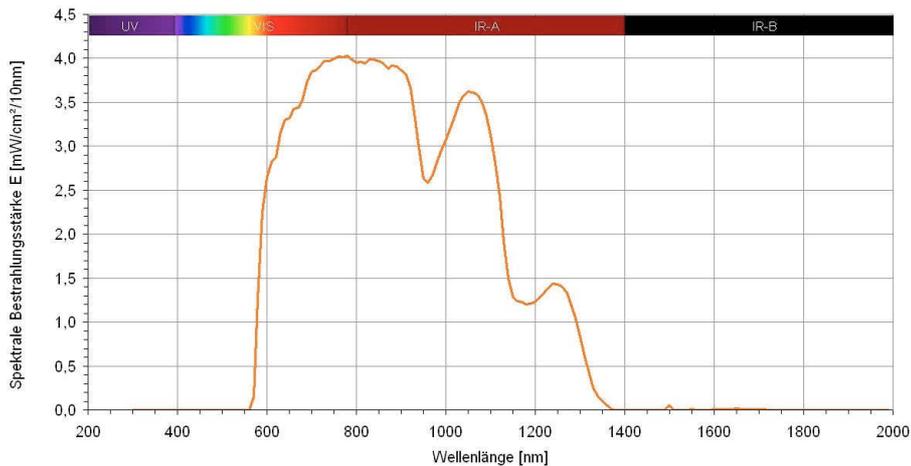


Abbildung 2.1: Emissionsspektrum der IRA-Lampe. Das Emissionsspektrum der wasergefilterten IRA-Lampe H 500 der Firma Hydrosun wurde laut Herstellerangaben mit einem Spektralphotometer an der FH München aufgezeichnet. (übernommen von Hydrosun Medizintechnik, Müllheim)

2.3 Behandlung von Zellkulturen mit Inhibitoren und Antioxidantien

Für die Inhibitor-Behandlung wurden die Zellen 1 h vor der IRA-Bestrahlung und 24 h nach der Bestrahlung mit dem jeweiligen Inhibitor gelöst im Medium unter oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank kultiviert. Folgende End-Konzentrationen im Medium wurden eingesetzt:

- 20 μM ERK1/2-Inhibitor PD98059 (Calbiochem Biosciences; La Jolla, CA)
- 10 μM p38-Inhibitor SB203580 (Calbiochem Biosciences; La Jolla, CA)
- 4 μM JNK-Inhibitor II SP600125 (Calbiochem Biosciences; La Jolla, CA)
- 20 μM PI3K-Inhibitor LY294002 (Calbiochem Biosciences; La Jolla, CA)
- 1 μM Cyclosporin A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 25 μM STAT3-Inhibitorpeptid (Calbiochem Biosciences; La Jolla, CA)

Die Inhibitoren PD98059, SB203580, SP600125 und LY294002 wurden in DMSO gelöst das STAT3-Inhibitorpeptid in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ und Cyclosporin A in Ethanol. Die Konzentrationen der Lösungsmittel im Medium waren niemals höher als 0,1 %. Bei den Bestrahlungsexperimenten wurden jeweils immer Lösungsmittelkontrollen mitgeführt.

Die Fibroblastenzellen wurden mit einer Endkonzentration im Medium von 20 mM der Antioxidantien N-Acetylcystein (NAC, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 100 nM MitoQ (freundliche Gabe von Michael P. Murphy, Cambridge, United Kingdom) 24 h vor und nach der Bestrahlung im Brutschrank kultiviert. NAC wurde in einer Stammlösung von 1M in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ angesetzt und mit KOH auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt und im

Anschluß sterilfiltriert. MitoQ wurde in sterilem DMSO gelöst und je nach Verwendung in verschiedenen Konzentrationen angesetzt.

2.4 Isolation der RNS

Die Isolation von RNS aus Fibroblasten erfolgte mittels des Kits NucleoSpinRNA II (Macherey-Nagel, Düren). Für die Präparation von RNS aus einer Fibroblastenkultur in einer 60 mm-Kulturschale wurden zur Lyse der Zellen 350 μl Lysispuffer RA1 gegeben. Für die Präparation aus einer 100 mm-Schale wurde 700 μl RA1 Lysispuffer verwendet. Nach erfolgter Zelllyse wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Das Ergebnis dieser Extraktion war RNS mit einer Konzentration von 1 bis 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) und UV-durchlässigen Einwegküvetten vom Typ UV-Küvette mikro (Brand). Bei der RNS-Präparation, die für die Microarray-Analysen eingesetzt wurde und hohe RNS-Ausbeuten von mindestens 9 μg Gesamtmenge in einem Volumen von maximal 10 μl erforderte, wurde die Konzentrationsbestimmung mittels des Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt, das nur 1 μl der RNS zur Konzentrationsbestimmung benötigt.

2.5 Microarray-Analysen mit dem Affymetrix HG-U133A Array System

2.5.1 Aufarbeitung der Proben, Amplifizierung und Hybridisierung auf den Microarrays

Die RNS wurde wie oben beschrieben nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die Qualität und Reinheit der präparierten RNS wurde unter Verwendung des *Agilent Bioanalyzer 2100 Systems* (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornien) bestimmt. Im Agilent Bioanalyzer wird nach dem Prinzip der Kapillarelektrophorese die isolierte Gesamt-RNS der Größe nach in ihre Fragmente aufgetrennt. Als Kriterium für die Integrität der analysierten RNS dienen der Quotient der 28S- zur 18S-rRNS. Die intakte ribosomale RNS erreicht einen maximalen Quotienten von 2,0 (siehe Abb. 2.2). Es wurden nur Proben verwendet, die ein 28S/18S rRNS-Verhältnis von über 1,8 besaßen.

Die RNS wurde dann zur Synthese der Erst- und Zweitstrang-cDNS unter Verwendung des *Affymetrix One-Cycle cDNA Synthesis Kits* (Affymetrix UK Ltd, High Wycombe, UK) verwendet. Im Anschluss erfolgte ein Wasch- und Reinigungsschritt mit Hilfe des *GeneChip Sample Cleanup Kits* (Affymetrix). Die Vorgehensweise erfolgte jeweils nach den Vorgaben des Herstellers. Für die *in vitro* Transkription der cDNS zu biotinylierter cRNS wurde das *IVT Labeling Kit* (Affymetrix) eingesetzt. Nach weiterer Aufreinigung und anschließender Fragmentierung, beides erfolgt nach Herstellerangaben mit Hilfe des (*GeneChip Sample Cleanup Kit*, Affymetrix), und einer weiteren Qualitäts- und Reinheitskontrolle mit dem *Agilent Bioanalyzer 2100 System* wurden 9 μg der Biotin markierten cRNS auf dem *Affymetrix HG-U133A Microarray* hybridisiert. Die Hybridisierung und

das anschließende Scannen der Microarrays erfolgte nach Herstellerangaben und wurde von der *Affymetrix Core Facility* des Biologisch-medizinischen Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

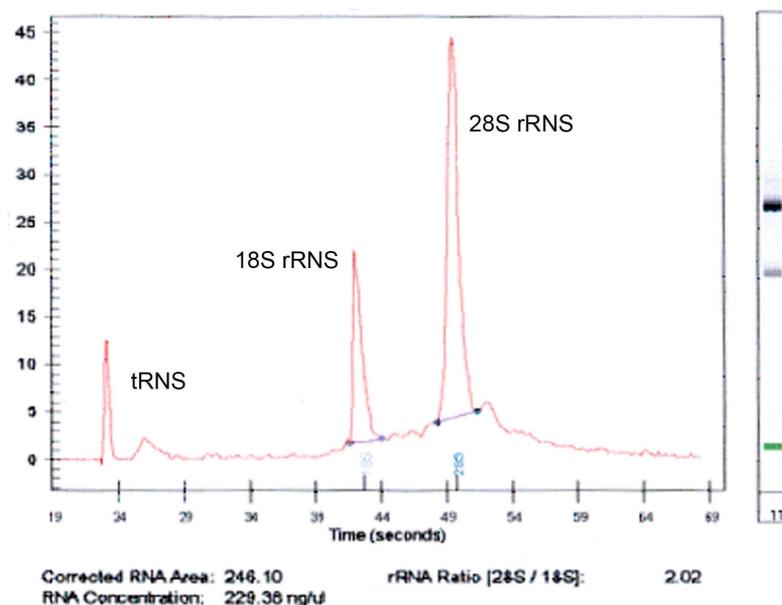


Abbildung 2.2: RNS-Qualitätskontrolle mittels Agilent Bioanalyser Qualitätskontrolle der isolierten RNS mittels des *Agilent Bioanalyser 2100 Systems*. Beispielgraph einer RNS-Präparation mit guter Qualität. Das Verhältnis der 18S rRNS zu 28S rRNS Peaks liegt bei 2 und es sind keine Degradationsprodukte erkennbar.

2.5.2 Normalisierung der Expressions-Rohdaten

Die hybridisierten Microarrays wurden unter Verwendung der *Microarray Suite* (MAS)-Software (Affymetrix) eingescannt und die die Rohdaten enthaltenden *.cel*-Dateien wurden mit der frei verfügbaren statistischen Softwareumgebung *R* in der Version 2.0.1 normalisiert. Hierfür wurde das *Affy package* des *BioConductor* Projekts verwendet (Gautier *et al.*, 2004).

Bei dem zur Normalisierung der Daten angewandten Algorithmus handelt es sich um die *robust multichip average* (RMA) Methode (Bolstad *et al.*, 2003). Erst durch die Normalisierung, dem Angleichen der Gesamtintensitätsverteilung zwischen den jeweils zueinander gehörenden Microarrays, werden die Arrays miteinander vergleichbar (siehe Abb. 2.4). Es zeigte sich, dass getrennte Normalisierungsvorgänge für die Fibroblastenzellen der

verschiedenen Spender zu Resultaten mit höheren Übereinstimmungen (größere Anzahl gemeinsam regulierter Gene) in der weiteren Auswertung führten. Aus diesem Grund kam dieses Verfahren zur Anwendung.

2.5.3 Hierarchisches Clustering

Beim hierarchischen *Clustering* handelt es sich um eine aggregative *Clustering*-Methode, d.h. es wird analysiert, wie ähnlich oder verschieden zwei Gruppen voneinander sind, z.B. die Genexpressionsprofile zweier Proben. Als Ergebnis erhält man ein Baumdiagramm, dessen Knotenpunkte die auftretenden *Cluster* repräsentieren. Im Idealfall würde man einen Baum mit zwei Hauptästen erhalten, an einem Ast die Expressionsprofile der behandelten Proben, am anderen Ast die Kontrollproben.

Die hierarchische *Clustering*-Analyse wurde unter Verwendung der *BRB-Array Tools* Version 3.2.3 durchgeführt, entwickelt von Dr. Richard Simons und Amy Peng Lam (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). Hierfür wurden die normalisierten Genexpressionsdaten aller Arrays in das *BRB-Array Tools* Programm eingeladen und das hierarchische *Sample-Clustering* mit den vorgegebenen Einstellungen *centered correlation* und *average linkage* durchgeführt. Die Einstellung *centered correlation* bedeutet die Verwendung der Pearson-Korrelation als Distanzmaß für den Vergleich zweier Expressionsprofile. Unter der Einstellung *linkage* definiert man das Distanzmaß, wenn im weiteren Verlauf des hierarchischen *Clusterings* die Distanz zwischen zwei *Clustern* bestehend aus mehreren Objekten mit verschiedenen Distanzen zueinander bestimmt werden muss. Mit der Einstellung *average linkage* wählt man, dass der Durchschnitt aller Einzelentfernungen bzw. -Differenzen zwischen allen Objektpaaren der zu untersuchenden *Cluster* als Distanzmaß verwendet wird. Im Gegensatz dazu bewirkt die Option *complete linkage*, dass die maximale Entfernung und *single linkage*, dass die kürzeste Distanz zwischen zwei Objektpaaren als Gesamt-Distanzmaß zwischen den zwei *Clustern* verwendet wird.

2.5.4 Filterstrategie zur Identifizierung durch IRA-Bestrahlung differentiell regulierter Gene

Zur Identifizierung der durch Infrarot A differentiell regulierten Gene in den *in vitro* Experimenten mit den Fibroblasten in Zellkultur kam folgende Filterstrategie zum Einsatz: Das zu einem jeweiligen Gen gehörende Transkript wurde als reguliert betrachtet, wenn es in wenigstens 3 der insgesamt 9 IRA-Bestrahlungspaare, bestehend aus IRA-bestrahlter Probe und zugehöriger *sham*-Kontrolle auf- bzw. abreguliert war. Ein Transkript wurde als reguliert betrachtet wenn das Verhältnis der zur Basis 2 logarithmisierten Expressionsintensitätswerte IRA-bestrahlten Probe zur *sham*-Kontrolle wenigstens 2 für aufregulierte Transkripte beträgt oder 0,5 für abregulierte Transkripte. Dies entspricht einer Auf- bzw. Abregulation um wenigstens den Faktor 2. Weitergehend wurde ein Transkript als differentiell exprimiert angesehen, wenn es eine Änderung in den *present-/absent-calls* von *absent* nach *present* oder von *present* nach *absent* zwischen Probe und Kontrolle gibt. Bei den *absent*- und *present-calls* handelt es sich um in den Rohdaten der Microarrays enthaltenen Informationen bezüglich eventuell vorhandener falsch positiver Hybridisierung

bei den einzelnen für ein Transkript stehenden *Probe Sets*. Ein *Probe Set* besteht aus 20 Proben-Paaren, die sich jeweils aus einer *Perfect Match* und einer *Mismatch* Oligonukleotidsequenz zusammensetzen. Diese sind komplementär zu Bereichen der Zielsequenz und fest auf den Microarray *gespottet*. Zur Vergabe der *Absent*- und *Present-Calls* wird nun das Verhältnis der an die *Perfect Match*- gegenüber den an die *Mismatch*-Sequenz gebundenen biotinylierten Oligonukleotide aus der auf den Microarray hybridisierten Probe herangezogen. Sind mehr *Perfect Match*- als *Mismatch*-Hybridisierungen vorhanden, so wird ein *Present-Call* vergeben. Überwiegen die *Mismatch*-Bindungen, so wird ein *Absent-Call* vergeben. Bei einem sehr schwach exprimierten Transkript wird man wenig bis gar keine *Perfect Match*-Bindungen des eigentlichen Transkriptes erhalten und unspezifische Bindungen von ähnlichen Sequenzen, die auch an die entsprechenden *Mismatch*-Sequenzen binden, werden überwiegen. Kommt es nach IRA-Bestrahlung aber z.B. zu einer Aufregulation des Transkriptes, so werden nun die an die *Perfect Match*-Sequenzen gebundenen Oligonukleotide gegenüber den *Mismatch* gebundenen unspezifischen überwiegen, und es kommt zu einem Wechsel der *Calls* von *Absent* nach *Present* zwischen Kontrolle und IRA-bestrahlter Probe. Somit wurde ein Wechsel in den *Calls* von *Absent* nach *Present* bzw. von *Present* nach *Absent* nach Bestrahlung durch IRA als weiteres Kriterium für die Regulation des jeweiligen Transkriptes gewertet.

2.5.5 Gene Ontology Clustering

Die *Unigene*-Nummern der gesamte Liste der differentiell exprimierten Gene in primären humanen dermalen Fibroblasten nach IRA Bestrahlung wurden als Ausgangsdaten für das *BiNGO* Version 1.1 (Maere *et al.*, 2005)-*Plugin* der *Cytoscape* Version 2.2 Software (Shannon *et al.*, 2003) verwendet. Das *Gene Ontology* (GO) *Clustering* (Gene, 2004) wurde für die Kategorien *GO Biological Process*, *GO Molecular Function* und *GO Cellular Component* durchgeführt, wobei der Cluster der differentiell exprimierten Gene gegen alle insgesamt vorhandenen Annotationen getestet wurde, was zu einer Tabelle von *Gene Ontology*-Klassen führte, in der alle GO-Klassen aufgeführt sind, die im zu untersuchten Cluster gefunden wurden mitsamt der Anzahl Gene innerhalb dieser Klasse und ihrer zugehörigen *Unigene* Nummern.

2.5.6 in silico-Promotor-Analysen

Für die *in silico* Promotor-Analyse der durch IRA-Bestrahlung regulierten Gene wurde die *Mamalian Promotor Database* (MPromDb, zu finden unter <http://bioinformatics.med.ohio-state.edu/MPromDb/>) verwendet (Sun *et al.*, 2006). Es wurde geprüft, für welche der IRA-regulierten Gene Einträge mit den hypothetischen Transkriptionsfaktorbindestellen (*predicted transcription factor binding sites*, abgekürzt: PTF) ausgehend von den Konsensus-Sequenzen vorhanden waren und diese wurden getrennt nach auf- und abregulierten Genen auf den lokalen PC heruntergeladen. Weiterhin wurden zwei Kontrollgruppen gebildet. Die eine Kontrollgruppe enthielt nicht IRA-regulierte Gene, für die in allen Expressionsprofilen *present calls* vergeben wurden. Die zweite Kontrollgruppe bestand ebenfalls aus nicht durch IRA-regulierten Genen, die aber in allen Profilen einen *absent call* aufwiesen. Die Größe der Kontrollgruppen wurde denen der auf- bzw. abregulierten Gene angepasst. Als nächster Schritt wurde ermittelt,

in wievielen Fällen eine spezifische Transkriptionsfaktorbindestelle in den jeweiligen Gruppen vorkommt. Kam eine der hypothetischen Bindestellen innerhalb der Promotorsequenz eines Gens mehrfach vor, so wurde sie zur Bestimmung der Gesamthäufigkeit trotzdem nur einfach gewertet. Zur Ermittlung der Gesamthäufigkeiten der PTFs wurde folgendes Skript programmiert in *Perl* (Active Perl Version 5.8.8. for Windows, Active State, Vancouver BC) verwendet:

```
#!/usr/bin/perl
use strict;
my $dir = shift or die "Usage: count_names dir_name\n";
opendir(DIR,$dir) or die "Can't open $dir!\n";
my %gencount;
while (defined (my $file=readdir(DIR))) {
if ($file =~ /\.*\.\txt/) {
open(FILE,"<$dir/$file") or die "Can't open file $dir/file\n";
my %gens;
while (my $line = <FILE>) {
chomp $line;
next until length($line);
my @values = split("\t",$line);
$gens{$values[1]} = 1;
}
foreach my $gen (keys %gens) {
if ($gencount{$gen}) {
$gencount{$gen}\++;
}
else {
$gencount{$gen} = 1;
}
}
}
}
open (OUT,">$dir\_count.txt");
print OUT "Gens for directory $dir\n";
foreach my $gen (keys %gencount) {
print OUT "$gen\t$gencount{$gen}\n";
}
close OUT;
```

Um in einer der Gruppen verstärkt vorhandene Transkriptionsfaktorbindestellen zu identifizieren, wurde die Häufigkeit der einzelnen PTFs nun gruppenweise verglichen. Während ein Großteil der PTFs eine gleichmäßige Verteilung zwischen den vier Gruppen zeigte (siehe Gesamtliste der PTF-Häufigkeiten im Anhang), traten manche PTFs nur gezielt in einigen der Gruppen auf. So gab es PTFs, die ausschließlich in einer oder beiden Gruppen mit den IRA-regulierten Genen auftraten, in manchen Fällen zusätzlich auch in der Kontrollgruppe mit den dauerhaft nicht exprimierten oder in der Expression nicht detektierbaren Genen (*absent calls*). Diese PTFs waren jedoch niemals in der Kontrollgruppe mit den nicht-IRA-regulierten, aber dauerhaft aktiven Genen (*present calls*) zu finden.

2 Material und Methoden

Daher kamen diese zu den entsprechenden PTFs zugehörigen Transkriptionsfaktoren als mögliche Transkriptionsfaktor-Kandidaten der IRA-Antwort in Betracht, während auch der umgekehrte Fall von PTFs zu beobachten war, die ausschließlich bei den nicht-IRA-regulierten, immer konstitutiv exprimierten Genen auftraten, die für die IRA-Antwort somit keine Rolle spielen.

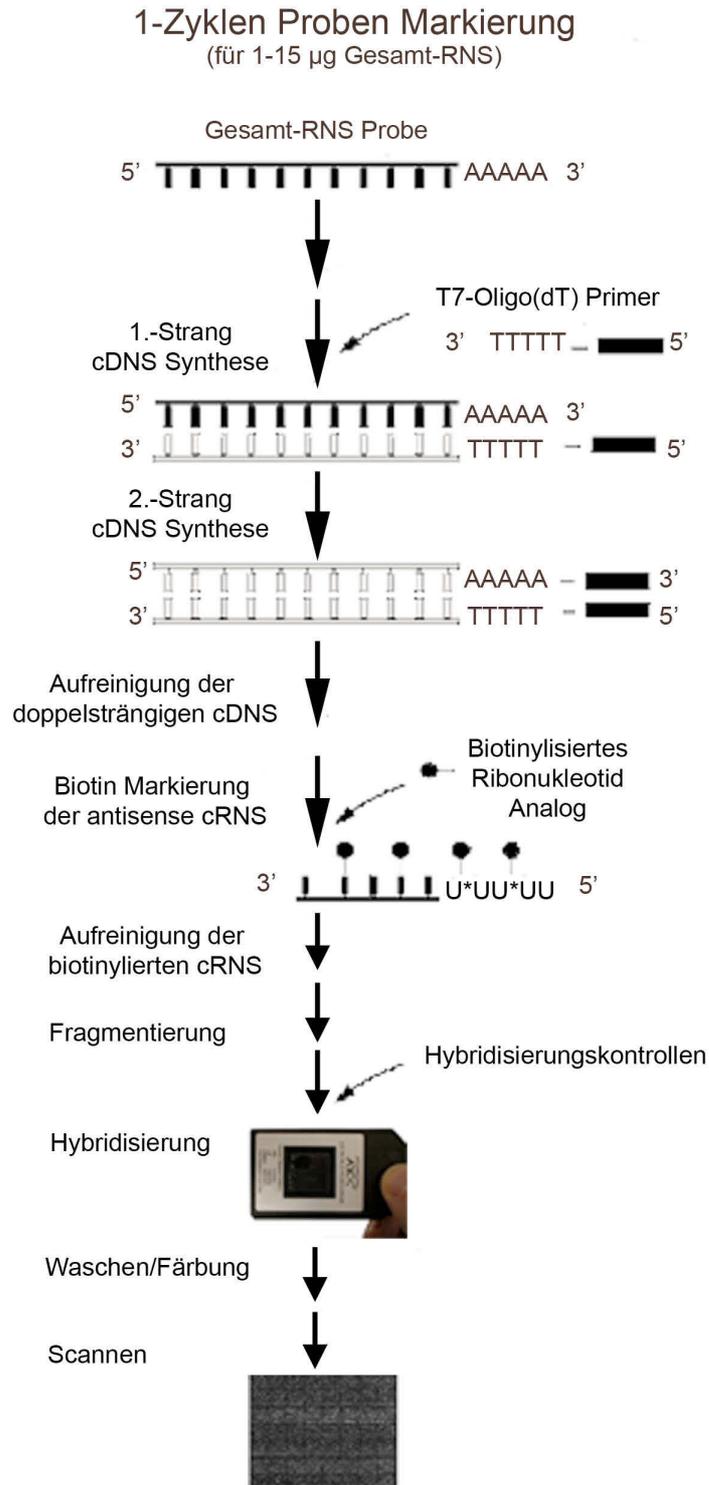


Abbildung 2.3: Probenamplifizierung für Affymetrix Microarrays. Das Schema zeigt die Amplifizierungsschritte und Probenaufbereitung für die Affymetrix Microarrays mittels der ebenfalls von Affymetrix vertriebenen Synthese- und Reinigungs-Kits. (übernommen von Affymetrix)

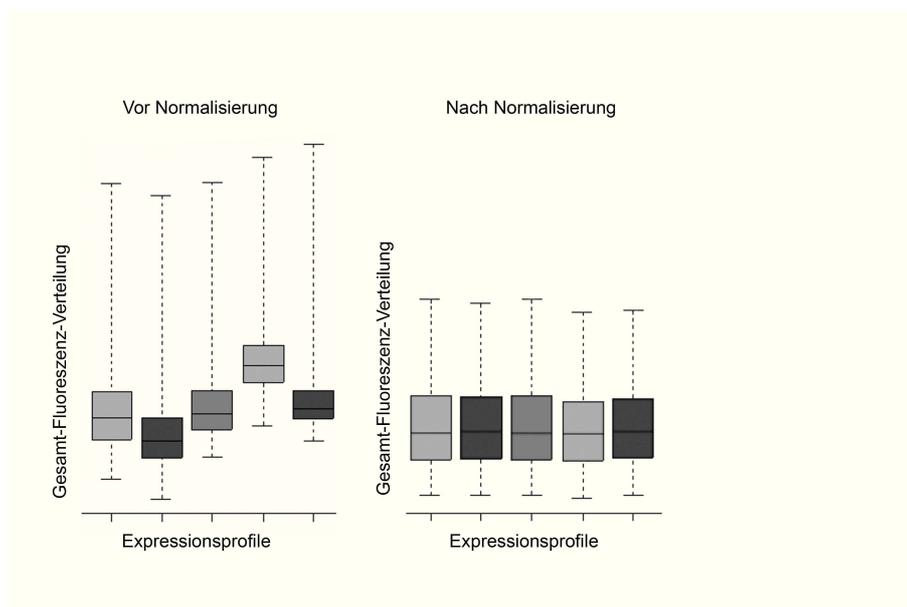


Abbildung 2.4: Normalisierung von Expressionsprofilen Aufgetragen ist die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten verschiedener Expressionsprofile vor und nach dem Normalisierungsprozess. Der Median und die Varianz der Signalintensitäten der verschiedenen Expressionsprofile wird angeglichen und macht die unterschiedlichen Expressionsprofile miteinander vergleichbar.

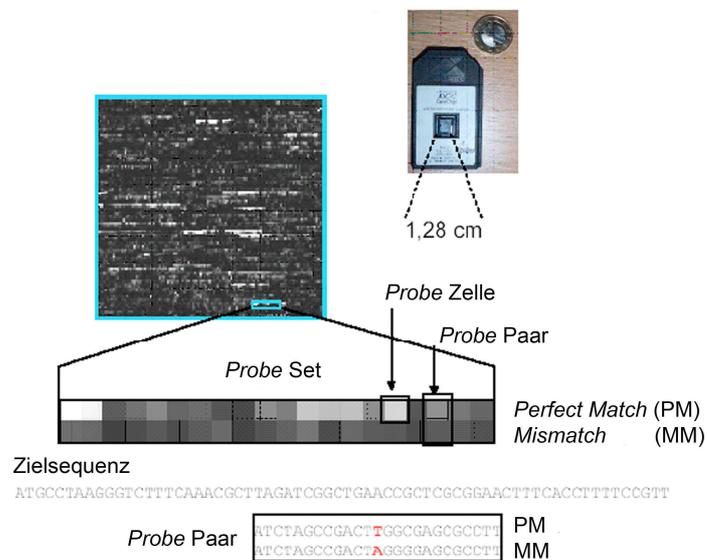


Abbildung 2.5: Aufbau der Probe Sets auf dem Affymetrix HG-U133A Microarray. Ein Probe Set besteht aus 20 Probe-Paaren, die jeweils aus einer Perfect Match- und einer Mismatch Oligonukleotidsequenz gegenüber der Zielsequenz bestehen. Die von der Affymetrix MAS Software vergebenen Present- bzw. Absent-Calls ergeben sich aus dem Verhältnis von Perfect Match zu Mismatch gebundenen, biotinylierten Oligonukleotiden aus der Zielsequenz bezogen auf ein Probe Set. (überarbeitet nach Affymetrix)

2.6 Realtime-PCR

Die *realtime*-PCR ist eine semiquantitative PCR mit vorhergehender reverser Transkription. Das Ausgangsmaterial für die *realtime*-PCR stellt die gesamte RNS der Zellen dar, diese wird durch reverse Transkription in cDNS umgeschrieben (Siehe Kapitel 2.4). Bei dieser Methode enthält der PCR-Ansatz einen fluoreszierenden Farbstoff (SYBR Green, Invitrogen), welcher unter Zunahme der Fluoreszenzintensität in doppelsträngige DNS interkaliert. Die Synthese des Amplifikates korreliert daher mit dem Ansteigen der Fluoreszenzintensität von Zyklus zu Zyklus. Dadurch wird die relative Quantifizierung nach der so genannten $\Delta\Delta$ -CT Methode möglich (Siehe Kapitel 2.6.1). Als PCR-Gerät wurde hierbei ein ABI PRISM 7000 der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Aufzeichnung der Rohdaten und die nachfolgende Analyse erfolgte mit der Software ABI PRISM 7000 SDS 1.1, (ebenfalls Applied Biosystems).

2.6.1 Durchführung der cDNS-Synthese und realtime-PCR

Für die Synthese der cDNS wurden jeweils 100 ng RNS eingesetzt. Die Durchführung der cDNS-Synthese und der realtime-PCR ist im folgenden in tabellarischer Form dargestellt:

Tabelle 2.1: Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 1

Volumen in μl	Substanz
1	Random Primer (Invitrogen)
1	10 mM dNTP Mix (Invitrogen)
7	H ₂ O für die PCR (Invitrogen)
3	RNS (100 ng)
5 min Denaturierung bei 65 °C, dann 4 °C	

Tabelle 2.2: Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 2

Volumen in μl	Substanz
4	5 x 1.-Strag Synthesepuffer (Invitrogen)
2	100 mM DTT
1	RNAse-Out (Invitrogen)
2 min Inkubation bei 37 °C	

Jeder Ansatz zur cDNS-Synthese beinhaltetete 12 μl cDNS-Synthesemix 1, 7 μl cDNS-Synthesemix 2 und 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen). Das Programm zur Synthese von cDNS ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: PCR-Programm zur Synthese von cDNS

T in °C	Zeit in min
25	10
37	50
70	15
4	∞

Tabelle 2.4: Pipettierschema für die *realtime-PCR*

Volumen in μl	Substanz
12,5	Sybr Green PCR-Mix (inklusive ROX passiv Fluorochrom, Invitrogen)
1	Primer fwd
1	Primer rev
7,5	H ₂ O für die PCR (Invitrogen)
3	cDNS

Tabelle 2.5: PCR-Programm für die *realtime-PCR*

T in °C	Zeit in sec
94	20
55	20
72	30
40 Zyklen	

2.6.2 Primerdesign für die *realtime-PCR*

Als Ausgangspunkt dienten die Identifikationsnummern (*Accession-Nr.*) für die mRNA Sequenzen der regulierten Transkripte auf den Microarrays, die für die Verifizierung mittels *realtime-PCR* ausgewählt wurde. Die Primer wurden mit Hilfe der frei im Internet verfügbaren Software *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu>) hergestellt, wobei die Lage der Primer-Bindungssequenzen so gewählt wurde, dass sie intronüberspannend waren. Desweiteren wurde ebenfalls über die Verwendung der *Blast*-Software (<http://www.ncbi.gov>) überprüft, dass es keine weiteren möglichen Bindungsstellen im menschlichen Genom gibt, was von den gewählten Primern ebenfalls amplifiziert werden könnte. Mit dieser Vorgehensweise wurden Primer generiert, welche spezifisch die gewünschte cDNS, jedoch keine genomische DNS amplifizieren konnten. Die Produktgrösse des Amplifikates sollte zwischen 100 und 150 Nukleotiden Länge betragen, die Primer zwischen 18 und 23 Nukleotide Länge besitzen und der Schmelzpunkt-Wert (T_m) der Primer zwischen 57° und 63° Celsius betragen. Mittels der ABI PRISM 7000 PCR-Maschine wurden nach erfolgtem PCR-Lauf Schmelzkurven der PCR-Produkte der jeweiligen Primerpaare durchgeführt und somit kontrolliert, dass nur ein spezifisches Amplifikationsprodukt entstanden ist.

2.6.3 Primersequenzen für die realtime-PCR

Alle Primer wurden durch die Firma Operon synthetisiert und im Reinheitsgrad "Salt-Free" bestellt.

Tabelle 2.6: Primer Sequenzen für die *realtime*-PCR

Name	Sequenz	Produktlänge	mRNS-Identifikations-Nr.
18s-rRNS forw	5'-GCC GCT AGA GGT GAA ATT CTT G-3'	66 bp	NR003286
18s-rRNS rev	5'-CAT TCT TGG CAA ATG CTT TCG-3'	66 bp	NR003286
ATP1B1 forw	5'-TGG CTA CAA AGA GGG CAA AC-3'	138 bp	NM001677
ATP1B1 rew	5'-CAC TGA ACG GGA AGG ACA TT-3'	138 bp	NM001677
BAD forw	5'-CGG AGG ATG AGT GAC GAG TT-3'	123 bp	U66879
BAD rew	5'-CCA CCA GGA CTG GAA GAC TC-3'	123 bp	U66879
BAX forw	5'-GGG GAC GAA CTG GAC AGT AA-3'	122 bp	NM004324
BAX rew	5'-CAG TTG AAG TTG CCG TCA GA-3'	122 bp	NM004324
FASTK forw	5'-AGT GGT ACG CAG CCA GGA T-3'	128 bp	AK023141
FASTK rew	5'-ACG CAC AAT CAG AGC ATG AG-3'	128 bp	AK023141
FN1 forw	5'-ATG ATG AGG TGC ACG TGT GT-3'	135 bp	AJ276395
FN1 rew	5'-CTC TTC ATG ACG CTT GTG GA-3'	135 bp	AJ276395
IL6ST forw	5'-TGA ACG AGG GGA AGA AAA TG-3'	120 bp	NM002184
IL6ST rew	5'-GTT TTG CTT TGC AATC AGC A-3'	120 bp	NM002184
ITPR2 forw	5'-CAG GCT CTG GAC AGA AAT CC -3'	108 bp	NM002223
ITPR2 rew	5'-AAT TCC ATT GTC AGG GCA AA -3'	108 bp	NM002223
ITPR3 forw	5'-AAC TAC CTG GCT GCT GAG GA -3'	131 bp	D26351
ITPR3 rew	5'-GCC ACC AGG CAG TAC TTG AT -3'	131 bp	D26351
PIK3R3 forw	5'-AGC CTG TGG AAA TGG CAT AG-3'	127 bp	BC021622
PIK3R3 rew	5'-CTC TCA TGA AGG AGG CCA AG-3'	127 bp	BC021622
PIP5K1B forw	5'-AAG GAT GAG AAG CGG GAT TT-3'	14 bp	U78581
PIP5K1B rew	5'-AAT TGT GGT TGC CAA GGA AG-3'	14 bp	U78581
STAT3 forw	5'-CGA GCA GCT GAC TAC ACT GG-3'	106 bp	BC000627
STAT3 rew	5'-CTT GCC AGC CAT GTT TTC TT-3'	106 bp	BC000627
TNFRSF6B forw	5'-GAC AAG GTG CTG GCT GTG T-3'	127 bp	AK000485
TNFRSF6B rew	5'-GGT CTG TGC ACG TCT GTG AG-3'	127 bp	AK000485
VCAM1 forw	5'-AAG ATG GTC GTG ATC CTT GG-3'	138 bp	NM001078
VCAM1 rew	5'-GGT GCT GCA AGT CAA TGA GA-3'	138 bp	NM001078

2.7 Western-Blot

Für die Western-Blot-Analyse wurden Gesamtzell-Lysate verwendet. Bei der Herstellung von Zeitreihen über wenige Stunden wurde auf eine Proteinbestimmung verzichtet und zu erntende Proben jeweils in einem identischen Volumen 2x Auftragspuffer direkt lysiert. Hierbei wurden zum Lysieren von konfluenten Fibroblasten Zellkulturen in 60 mm Kulturschalen 150 μ l, in 100 mm Kulturschalen 300 μ l Auftragspuffer eingesetzt. Die mit Auftragspuffer bedeckten Zellen wurden danach mit einem sterilen Kratzer möglichst sauber von der Kulturschale entfernt und bei 95 °C für 5 min denaturiert.

2.7.1 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) ist eine denaturierende Gelelektrophorese in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel. Die aufzutrennende Probe wurde hierbei zunächst in einem 3%igen Sammelgel konzentriert und dann in einem 12%igen Trenngel gemäß der Größe ihrer Komponenten aufgetrennt. Als Elektrophoresekammer wurde das Modell Novex Mini-Cell der Firma Invitrogen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Die Elektrophorese wurde spannungsreguliert bei ca. 180 V bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung durchgeführt. Die Kontrolle der gewünschten Auftrennung war durch den Einsatz farbig vorgefärbter Proteinstandards (PeqGold Protein Marker IV, Peqlab) möglich.

Trenngel:	Sammelgel:
380 mM Tris HCl pH 8,8	125 mM Tris HCl pH 6,8
12 % Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)	3 % Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)
0,1 % SDS	0,1 % SDS
0,1 % TEMED	0,1 % TEMED
0,1 % APS	0,1 % APS

2.7.2 Western-Blot

Beim Western-Blot wurden Proteine aus dem Gel einer Gelelektrophorese heraus auf eine Membran übertragen und dort immunologisch nachgewiesen. Es wurden Nitrozellulose-Membranen (Schleicher&Schuell Biosciences) der Porengröße 0,2 μ m in Verbindung mit einer Blotkammer vom Typ Fast-Blot (Biometra) verwendet. Der Aufbau war dabei folgender: Kathode, Blotpapier (Blotting Paper 2 mm, Schleicher&Schuell Biosciences), Gel, Nitrozellulose-Membran, Blotpapier, Anode. Vor dem Aufbau der Aparatur wurden die Blotpapiere und die Membranen in Transfer-Puffer inkubiert. Für den Protein-Transfer wurde die Aparatur 80 min lang stromstärkereguliert bei 100 mA betrieben (100 mA pro 7 x 8 cm Membran).

2 Material und Methoden

Der Ablauf des Western-Blots mit immunologischem Nachweis war dabei stets folgender:

- Blockieren nicht mit Protein gesättigter Membranregionen mit 5 % Milchpulver in TBST (min. 1 h)
- Inkubation mit Erstantikörper über Nacht bei 4 °C auf Schüttler
- 1x Spülen mit TBST
- 3x Waschen mit TBST (je ca. 5 min)
- Inkubation mit Zweitantikörper (ca. 1 h)
- 1x Spülen mit TBST
- 3x Waschen mit TBST (je ca. 5 min)
- Inkubation mit Chemilumineszenzreagenz (5-10 min)

Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteintransfers wurden die Membranen vor dem Blockieren mit Ponceau S gefärbt. Die Membranen können vor dem Blockieren durch mehrmaliges Waschen mit TBST wieder entfärbt werden.

Alle verwendeten Erst- und Zweitantikörper, sowie ihre Eigenschaften, fasst Tabelle 2.7 zusammen. Die eingesetzten Antikörper wurden entsprechend Herstellerangaben entweder in 5 % Milchpulver in TBST oder in 5 % BSA in TBST angesetzt.

Nach erfolgter Belichtung können Erst- und Zweitantikörper wieder von der Membran entfernt werden, um weitere Erstantikörper einzusetzen. Dieser Vorgang wird als Stripping bezeichnet. Das Stripping erfolgt durch Inkubation der Membran in Stripping-Puffer bei 55 °C unter schütteln. Je nach aufgetragener Proteinmenge erfolgt diese Inkubation für 15 bis 30 min. Die im Stripping-Puffer enthaltenen Detergenzien wurden durch gründliches Waschen der Membran mit TBST wieder entfernt, z.B. drei mal ca. 40 min. Die Waschschritte wurden bis zur Geruchsfreiheit der Membran wiederholt.

Tabelle 2.7: Liste der für Western-Blots verwendeten Antikörper

Erstantikörper			
Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Aktin A5441	Maus	Sigma	1/80.000
GAPDH ab9484	Maus	Abcam	1/60.000
IP ₃ Rezeptor 407143	Kaninchen	Calbiochem	1/250
Lamin A+C ab8984	Maus	Abcam	1/250
PI-3-Kinase 528107	Maus	Calbiochem	1/1000
STAT3 ab5073	Ziege	Abcam	1/2000
Zweitantikörper			
Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
HRP-anti Ziege A5420	Kaninchen	Sigma	1/1000
HRP-anti Maus P0260	Kaninchen	DakoCytomation	1/1000

2.7.3 Puffer und Lösungen für Western-Blot und Gelelektrophorese

Alle Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{deion.} angesetzt und, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

2x Auftragspuffer:	4x Auftragspuffer:
125 mM Tris HCl	500 mM Tris HCl
4 % SDS	16 % SDS
20 % Glycerin	30 % Glycerin
100 mM DTT	400 mM DTT
0,01 % Bromphenolblau	0,02 % Bromphenolblau
pH 6,8	pH 6,8
10x Laemmli Gelelektrophorese-Puffer:	10x TBS-Puffer:
2 M Tris	1,5 M NaCl
0,2 mM Glycin	0,5 M Tris
1 % SDS	pH 7,6
TBST-Puffer:	Ponceau S Lösung:
0,15 M NaCl	0,1 % Ponceau S
0,05 M Tris	5 % Essigsäure
0,1 % Tween 20	
Transfer-Puffer:	Stripping-Puffer:
20 % Methanol	100 mM β -Mercaptoethanol
50 mM Tris	60 mM Tris
40 mM Glycin	2 % SDS
0,037 % SDS	pH 6,8

2.7.4 Dokumentation und Quantifizierung

Die Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte mittels einer digitalen Geldokumentationsanlage vom Typ FluorChem 8900 der Firma Alpha Innotech. Als Substrat für die an die Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase diente das ChemiGlow West Substrat der Firma Biozym.

3 Ergebnisse

3.1 Infrarot-A-Strahlung reguliert eine Vielzahl von Genen in humanen dermalen Fibroblasten

Um nach IRA-Bestrahlung differentiell regulierte Gene zu identifizieren, wurden ein Satz von neun voneinander unabhängigen Probenpaaren analysiert (IRA-bestrahlt (860 J/cm^2) versus sham). Hierfür wurden primäre humane dermale Fibroblasten von drei verschiedenen Spendern verwendet (im weiteren als F1 bis F3 bezeichnet). Für einen ersten Eindruck der von den Microarray Experimenten gelieferten Daten wurde ein unüberwachtes hierarchisches *Clustering* durchgeführt, basierend auf allen 22.283 auf den Arrays vorhandenen Transkripten (Affymetrix HGU133A Microarrays (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006)). Das aus dieser Analyse resultierende Dendogramm (siehe Abb. 3.1) zeigt eine heterogene Verteilung der *sham*-Kontrollen und IRA-bestrahlten Proben mit einer näheren Beziehung von Proben eines Spenders als innerhalb einer Behandlungsgruppe (IRA-bestrahlt bzw. *sham*).

Um trotz dieser interindividuellen Unterschiede neue IRA-regulierte Gene identifizieren zu können, wurde ein Selektionsalgorithmus angewendet, bei dem die Transkripte ausgewählt wurden, die in wenigstens drei unabhängigen Experimenten einheitlich reguliert waren (siehe auch Kapitel 2.5.4). Dieser Filterprozess lieferte 250 aufregulierte Transkripte und 349 abregulierte Transkripte zum analysierten Zeitpunkt von 24 Stunden nach der IRA-Bestrahlung (siehe Anhang unter Abschnitt 9.1).

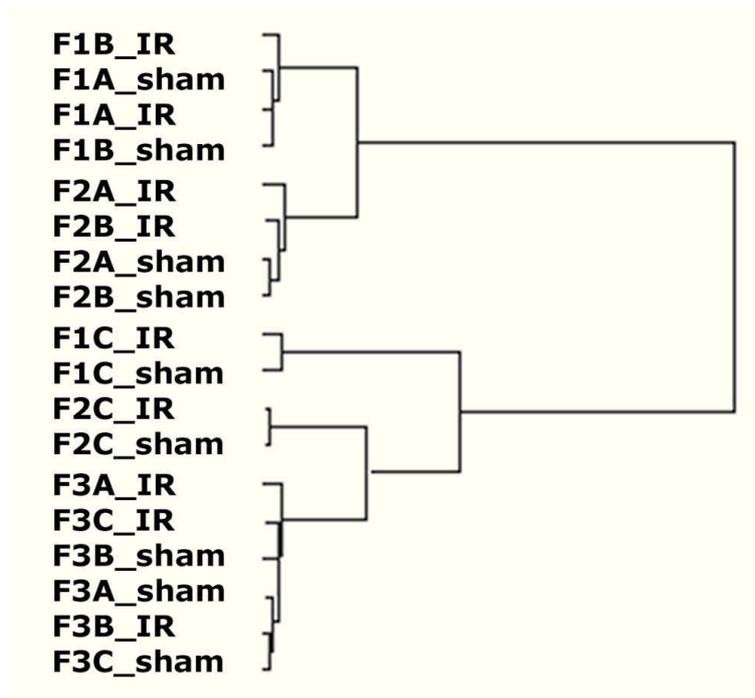


Abbildung 3.1: Hierarchisches *Clustering* der Expressionsprofile. Das Clustering der gesamten Genexpressionsprofile von allen 18 Proben wurde ausgehend von den vollständigen *Probe Set*-Listen durchgeführt. Im Dendrogramm (Einstellung: *average linkage, centered correlation*) bezeichnen F1, F2 und F3 Zellen von verschiedenen Spendern, A, B und C repräsentieren verschiedene Bestrahlungsexperimente; IRA sind die Infrarot-A-bestrahlten Proben, *sham* die entsprechenden schein-behandelten Kontrollen.

3.1 Infrarot-A-Strahlung reguliert eine Vielzahl von Genen in humanen dermalen Fibroblasten

Tabelle 3.1: Auswahl der durch IRA Bestrahlung regulierten Gene. Zusammenfassung von differentiell exprimierten Genen nach IRA-Bestrahlung. Die in der Tabelle aufgeführten Gene wurden für weiterführende realtime-PCR Experimente ausgewählt aufgrund ihres Bezugs zu Alterungsprozessen, Kontrolle der Apoptose oder einer wahrscheinlichen Beteiligung im Calcium-abhängigem retrograden mitochondrialem Signalfluß. + oder - mit zugehöriger Zahl zeigt an, wie oft diese Gene in den neun unabhängigen Microarray- Experimenten auf- oder abreguliert sind.

Ref.ID	Unigene-Nr.	x-fach reguliert	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biologische Funktion	In der Literatur beschriebene Funktion
201242_s_at	Hs.78629	-3	ATPase, Na ⁺ -/K ⁺ -transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	Kaliumionen Transport // Natriumionen Transport	im Alter moduliert im Rattenhirn (Dencher <i>et al.</i> , 2007). Es erhöht die Produktion von mitochondrialem ROS und reguliert die intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration (Xie & Cai, 2003).
209364_at	Hs.76366	+3	BCL2-antagonist of cell death	BAD	Induktion der Apoptose	ROS-moduliertes Zellüberleben über den PI3Kinase-/AKT-Weg ist direkt reguliert über das proapoptische BAD-Protein (Clerkin <i>et al.</i> , 2008).
211833_s_at	Hs.159428	-3	BCL2-associated X protein	BAX	negative Regulation von Überlebens-Genprodukten // Induktion der Apoptose	BAX und BAK regulieren ITPR1 und Calcium-Ausfluss aus dem ER (Oakes <i>et al.</i> , 2005). Abregulation auf Proteinebene und Aktivierung der Translokation nach IRA-Bestrahlung (Frank <i>et al.</i> , 2004)
214114_x_at	Hs.75087	+3	FAST kinase	FASTK	Induktion der Apoptose durch extrazelluläre Signale	FAST inhibiert UV- induzierte Apoptose (Li <i>et al.</i> , 2004).
214701_s_at	Hs.418138	-4	Fibronectin 1	FN1	Zellbewegung // Signaltransduktion	Protein der extrazellulären Matrix, involviert in Zelladhäsion, Migration, Wundheilung, abreguliert über glykosilierte Endprodukte (Molinari <i>et al.</i> , 2008). Fibronectin ist Teil eines Netzwerkes von Proteinen im Zusammenhang mit Langlebigkeit und Alterungs-bezogenen Krankheiten (Wolfson <i>et al.</i> , 2009).
204863_s_at	Hs.71968	-3	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	Zelloberflächen Rezeptor gekoppelte Signaltransduktion // Immunantwort	IL6 induziert VEGF-Expression via IL6ST und ERK (Omori <i>et al.</i> , 2004). Der lösliche IL-6-Rezeptor induziert Ca ²⁺ -Ströme und verändert selektiv die Chemokin-Expression in humanen dermalen Fibroblasten (Spörri <i>et al.</i> , 1999). IL6 vermittelt die UVA-bedingte Induktion von MMP-1 (Wenk <i>et al.</i> , 2004).
202662_s_at	Hs.512235	-3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	ITPR2	Calciumkanäle	Phosphoinositol abhängiger Calcium-Transport vom ER zum Zytosol. Cytochrom C, welches aus den Mitochondrien nach IRA-Bestrahlung freigesetzt wird (Frank <i>et al.</i> , 2004), bindet an IP ₃ -Rezeptoren und amplifiziert so die Calcium-Freisetzung (Boehning <i>et al.</i> , 2003).
201187_s_at	Hs.77515	-3	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	ITPR3	Calciumkanäle	Phosphoinositol abhängiger Calcium-Transport vom ER zum Zytosol. Cytochrom C, welches aus den Mitochondrien nach IRA-Bestrahlung freigesetzt wird (Frank <i>et al.</i> , 2004), bindet an IP ₃ -Rezeptoren und amplifiziert so die Calcium-Freisetzung (Boehning <i>et al.</i> , 2003)
202743_at	Hs.372548	-3	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	PIK3R3		DIE PI3Kinase ist reguliert in MnSOD-überexprimierenden <i>C.elegans</i> und <i>Drosophila daf-2</i> -Mutanten (Curtis <i>et al.</i> , 2007). PI3K agiert anti-apoptisch über den AKT-Signal-Pfad und ist ein wichtiger intrazellulärer Regulator von epidermaler Homöostase und Reparatur (Pankow <i>et al.</i> , 2006).
217477_at	Hs.297604	-4	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	PIP5K1B		Die PIP5Kinase ist involviert im Phosphoinositol-Signalweg. Alterung erniedrigt den PIP ₂ -Gehalt der Zellen, aber hat keinen Effekt auf die Aktivität von Phosphoinositid-Kinasen (Zambrzycka, 2004).
208992_s_at	Hs.421342	+4	Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	Akute Phase Antwort	STAT3 ist reguliert in MnSOD-überexprimierenden <i>C.elegans</i> und <i>Drosophila daf-2</i> -Mutanten (Curtis <i>et al.</i> , 2007). Die PI3Kinase agiert anti-apoptisch über den AKT-Signal-Pfad und ist ein wichtiger intrazellulärer Regulator von epidermaler Homöostase und Reparatur (Pankow <i>et al.</i> , 2006).

3 Ergebnisse

Ref_ID	Unigene-Nr.	x-fach reguliert	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biologische Funktion	In der Literatur beschriebene Funktion
213829_x.at	Hs.348183	+4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy	TNFRSF6B	Anti-Apoptose // Onkogenese	Es wirkt anti-apoptotisch und ist stark exprimiert in Krebszellen. Induziert transkriptionelle Aufregulation von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und IL-8 (Yang <i>et al.</i> , 2005).
203868_s.at	Hs.109225	-3	Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	Zell-Zell Adhäsion	VCAM-1 spielt eine Rolle in der Wundheilung und Angiogenese. Es ist aufreguliert in oxidativ gestressten, alten Ratten, (Zou <i>et al.</i> , 2006).

Um die zelluläre Antwort gegenüber IRA besser zu verstehen, wurden als nächster Schritt die Transkriptomdaten nach ihrer Funktion gruppiert. Dies erfolgte unter Verwendung von aus der *Gene Ontology*(GO)-Klassifizierung abgeleiteten Kategorien. Diese Analyse lieferte vier Gruppen von IRA-regulierten Genen, auf den der Fokus der weiteren Untersuchungen gerichtet wurde:

- (i) Metabolismus der extrazellulären Matrix (ECM),
- (ii) Gene der Calcium-Homöostase,
- (iii) Stress-Signalwege,
- (iv) Regulation der Apoptose und daran beteiligter Signalprozesse.

Tabelle 3.2: IRA-beeinflußte Prozesse und zugehörige Gene. Untergeordnete Klassen von IRA beeinflussten Prozessen und der darin involvierten Gene basierend auf Gene Ontology *Clustering*.

Gen	Symbol	Regulation durch IRA	Ref_ID	Unigene-Nr.	Gene Ontology - Biologische Funktion
Extrazelluläre Matrix					
cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	CDH10	AB	220115_s.at	Hs.92489	homophile Zelladhäsion
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	CEACAM1	AB	211883_x.at	Hs.512682	Immunantwort
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4	CEACAM4	AUF	207205_at	Hs.12	
cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3	CHRNB3	AUF	207859_s.at	Hs.96094	Synaptische Transmission
chromosome 1 open reading frame 38	C1orf38	AUF	210785_s.at	Hs.10649	Zelladhäsion
collagen, type I, alpha 1	COL1A1	AUF	202312_s.at	Hs.172928	epidermale Differenzierung
collagen, type VIII, alpha 1	COL8A1	AB	214587_at	Hs.114599	somatische Muskel Entwicklung
fibronectin 1	FN1	AB	214701_s.at	Hs.418138	Zellbeweglichkeit // Signaltransduktion
glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C	GRIN2C	AB	217573_at	Hs.436980	Ionentransport
integrin, alpha 10	ITGA10	AUF	206766_at	Hs.158237	Integrin-vermittelter Signalweg // Zell-Matrix Adhäsion
integrin, beta 5	ITGB5	AUF	214021_x.at	Hs.149846	Integrin-vermittelter Signalweg // Zell-Matrix Adhäsion
matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	AUF	204475_at	Hs.83169	Kollagen Katabolismus
neurologin 1	NLGN1	AB	205893_at	Hs.71132	Calcium-abhängige Zell-Zell Adhäsion
neurologin 4	NLGN4	AUF	207703_at	Hs.21107	Zelladhäsion
protocadherin LKC	PC-LKC	AB	220186_s.at	Hs.4205	homophile Zelladhäsion
sialic acid binding Ig-like lectin 7	SIGLEC7	AUF	216537_s.at	Hs.274470	Zelladhäsion
sialoadhesin	SN	AB	44673.at	Hs.31869	heterophile Zelladhäsion // Zell-Matrix Adhäsion
spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein	SPON1	AUF	209436_at	Hs.5378	
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	AB	203868_s.at	Hs.109225	Zell-Zell Adhäsion
vascular endothelial growth factor B	VEGFB	AUF	203683_s.at	Hs.78781	positive Regulation der Zellproliferation
vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	VAMP2	AUF	201557_at	Hs.25348	nicht selektiver Vesikel Transport
Calciumionen-Signalfuss					
ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	ATP2B4	AB	205410_s.at	Hs.343522	Kationen Transport // Calcium Ionen Transport
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	AB	201242_s.at	Hs.78629	Kalium Ionen Transport // Natrium Ionen Transport
cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	CDH10	AB	220115_s.at	Hs.92489	homophile Zelladhäsion
calcium-binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated (fibrousheathin 2)	CABYR	AB	219928_s.at	Hs.511983	
calponin 1, basic, smooth muscle	CNN1	AB	203951_at	Hs.21223	smooth muscle contraction
casein beta	CSN2	AB	207951_at	Hs.2242	Calcium Ionen Transport
chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	AUF	216598_s.at	Hs.303649	Calcium Ionen Homeostase // JAK-STAT Kaskade

3.1 Infrarot-A-Strahlung reguliert eine Vielzahl von Genen in humanen dermalen Fibroblasten

Gen	Symbol	Regulation durch IRA	Ref_ID	Unigene-Nr.	Gene Ontology - Biologische Funktion
chloride channel 3	CLCN3	AUF	201733_at	Hs.372528	Chlorid Transport
inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	ITPR2	AB	202662_s_at	Hs.512235	Calcium Kanäle
inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	ITPR3	AB	201187_s_at	Hs.77515	Calcium Kanäle
neuroigin 1	NLGN1	AB	205893_at	Hs.71132	Calcium-abhängige Zell-Zell Adhäsion
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	PIP5K1B	AB	217477_at	Hs.297604	
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma	PIP5K1C	AUF	212518_at	Hs.282177	
phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	PIK3R3	AB	202743_at	Hs.372548	
protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	PTPRD	AB	214043_at	Hs.323079	Transmembranrezeptor Protein Tyrosinphosphatase Signalweg
sodium channel, voltage-gated, type X, alpha	SCN10A	AB	208578_at	Hs.250443	Natrium Ionen Transport
tachykinin receptor 1	TACR1	AB	208048_at	Hs.1080	G-Protein Signalfuss, gekoppelt an IP3 second messenger
transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	TRPV2	AB	219282_s_at	Hs.279746	Kationen Transport
Stress-Signalweg					
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	CEACAM1	AB	211883_x_at	Hs.512682	Immunantwort
caspase recruitment domain family, member 10	CARD10	AUF	210026_s_at	Hs.57973	Aktivierung der NF-kappaB-inducing Kinase // Apoptose
chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	AUF	216598_s_at	Hs.303649	Calcium Ionen Homeostase // JAK-STAT Kaskade
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	CX3CL1	AB	823_at	Hs.80420	Immunantwort // Zell-Zell Signalfuss // Zelladhäsion
chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6	AUF	206336_at	Hs.164021	inflammatorische Antwort // Chemotaxis
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL9	AUF	203915_at	Hs.77367	Zell-Zell Signalfuss // Chemotaxis
gamma-glutamyltransferase 1	GGT1	AB	207131_x_at	Hs.352119	Glutathion Biosynthese
IL2-inducible T-cell kinase	ITK	AB	211339_s_at	Hs.211576	Zellverteidigungs Antwort // intrazelluläre Signalkaskade
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	IKBKKG	AUF	36004_at	Hs.43505	regulation of transcription // induction of apoptosis
interferon, alpha 10	IFNA10	AB	208261_x_at	Hs.282275	Verteidigungs Antwort
interleukin 1 receptor-like 1 ligand	IL1RL1LG	AUF	203679_at	Hs.446686	Zell-Zell Signalfuss
interleukin 12B	IL12B	AUF	207901_at	Hs.674	Regulation der Cytokin Biosynthese // JAK-STAT Kaskade
interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	IL16	AB	209827_s_at	Hs.170359	intrazelluläre Signalkaskade
interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	AB	204863_s_at	Hs.71968	Zelloberflächen Rezeptor gekoppelte Signaltransduktion // Immunantwort
lymphocyte antigen 6 complex, locus H	LY6H	AB	206773_at	Hs.159590	Zellverteidigungs Antwort
mannan-binding lectin serine protease 1	MASP1	AUF	206449_s_at	Hs.89983	Komplement Aktivierung
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8	AB	205027_s_at	Hs.432453	Zellwachstum und/oder Maintenance
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	MAP4K5	AB	211081_s_at	Hs.246970	Proteinkinase Kaskade // Aktivierung von JNK
signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	AUF	208992_s_at	Hs.421342	Akute-Phase Antwort
thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum)	TXNDC4	AUF	208957_at	Hs.154023	Elektronentransport // Regulation der Redox Homeostase
toll-like receptor 4	TLR4	AB	221060_s_at	Hs.174312	Aktivierung der NF-kappaB-inducing Kinase // Regulation der IL-6 Biosynthese
Apoptose					
B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	AB	203685_at	Hs.79241	Anti-Apoptose // Regulation des Zellzyklus
BCL2 binding component 3	BBC3	AUF	211692_s_at	Hs.87246	
BCL2-antagonist of cell death	BAD	AUF	209364_at	Hs.76366	Induktion der Apoptose
BCL2-associated X protein	BAX	AB	208478_s_at	Hs.159428	negative Regulation von Survival-Genprodukten
BCL6 co-repressor	BCOR	AB	219433_at	Hs.186424	
caspase recruitment domain family, member 10	CARD10	AUF	210026_s_at	Hs.57973	Aktivierung der NF-kappaB-inducing Kinase // Apoptose
caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	AB	211368_s_at	Hs.2490	Signaltransduktion // Apoptose
caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	CASP7	AB	207181_s_at	Hs.9216	apoptotisches Programm
Fas (TNFRSF6) associated factor 1	FAF1	AB	218080_x_at	Hs.12899	Apoptose
FAST kinase	FASTK	AUF	214114_x_at	Hs.75087	Induktion der Apoptose durch extrazelluläre Signale
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy	TNFRSF6B	AUF	213829_x_at	Hs.348183	Anti-Apoptose // Oncogenese

3.2 Metabolismus der ECM

In den letzten Jahren lag der Fokus der untersuchten IRA-induzierten Effekte auf Ebene der extrazellulären Matrix der Haut. Es ist daher nicht überraschend, dass die aus den Microarray-Analysen gewonnenen Daten die bereits gut etablierten Effekte von IRA auf Gene der ECM (z.B. MMP-1 und Col1A1 (Buechner *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008b; Kim *et al.*, 2006) um zusätzliche Gene erweitert. Im Detail wurden 21 nach IRA-Behandlung differentiell regulierte Gene gefunden, die eine Relevanz für die extrazelluläre Matrix aufwiesen. Um diese Ergebnisse mit einer zweiten unabhängigen Untersuchungsmethode zu validieren, wurden zwei IR-regulierte Gene, Fibronectin (FN1) und vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) ausgewählt und ihre Regulation durch IRA in neuen, unabhängigen Experimenten mittels *realtime*-PCR-Analyse untersucht. Mit diesem Ansatz konnte die Abregulation beider Gene nach IRA-Behandlung bestätigt werden (siehe Abb. 3.2 A & B). Fibronectin 1 ist ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix und an Zelladhäsion, Migration und Wundheilung beteiligt. Es ist gezeigt worden, dass Fibronectin 1 auch in gealterten humanen dermalen Fibroblasten vermindert exprimiert wird (Molinari *et al.*, 2008), und dies ebenfalls in lichtgealterten HaCat-Zellen der Fall ist (Lee *et al.*, 2005). Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 ist ebenfalls an Zelladhäsion, Migration und der Wundheilung beteiligt und es wurde in oxidativ gestresstem altem Gewebe differentiell exprimiert gefunden (Zou *et al.*, 2006). Die Modifikation der ECM durch IRA wird durch weitere Daten aus den Microarrays unterstützt, die eine Regulation von Integrinen (ITGA10, ITGB5) zeigen (siehe Tabelle 3.2) denen auch eine Rolle in der Lichtalterung zugeschrieben wird (Püschel *et al.*, 1995). Cadherin CDH10, ein Protein welches Calcium-abhängig die Zell-Zell-Adhäsion vermittelt, wurde ebenfalls nach IRA-Bestrahlung vermindert exprimiert vorgefunden, was in Übereinstimmung mit den Daten von Molinari *et al.* (2008) (Abregulation von Cadherinen im Alterungsprozeß) auf eine weitere Beteiligung von IRA an der Lichtalterung der Haut hindeutet.

3.3 Calciumionen-Homöostase

Die funktionale *Clustering*-Analyse lieferte 18 zu dieser Kategorie gehörende Gene. Um die Rolle von IRA in der Regulation Calcium-abhängiger Prozesse zu bestätigen, wurden 5 dieser Gene ausgewählt (ATP1B1, ITPR2, ITPR3, PIK3R3, PIP5K1B). In neuen, unabhängigen Experimenten wurde die Expression dieser fünf Gene nach IRA Bestrahlung mittels *realtime*-PCR analysiert (siehe Abb. 3.2 C bis G). In allen 5 Fällen konnten die Resultate der Microarray-Untersuchung bestätigt werden. Ein wichtiges Protein im Phosphoinositol-Signalweg ist die Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase (PIP5K1B), welche den IP₃-Vorläufer Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Weernink *et al.*, 2004) synthetisiert. Das PIP5K1B-Transkript war nach IRA-Bestrahlung vermindert exprimiert (siehe Abb. 3.2 G). Es konnte gezeigt werden, dass gealtertes Gewebe über erniedrigte Mengen von PIP₂ verfügt (Zambrzycka, 2004) und dieser physiologische Zustand aus einer andauernden, chronischen Abregulation der PIP5-Kinase resultiert. Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptoren vom Typ 2 und 3 (ITPR2 and ITPR3), beide abreguliert nach IRA (siehe Abb. 3.2 D und E,) sind verantwortlich für den Phosphoinositol-(IP₃)-abhängigen Calcium-Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Zytosol. Gene, die für die wichtigen Komponenten der Calcium-Transportwege codieren, inklu-

sive der IP_3 -Rezeptoren, regulieren über ihre Expression die Calciumionen-Beladung der ER-Lagerstätten (Kuo *et al.*, 1997). Weitere Hinweise auf die Beteiligung des Calciumbedingten Phosphatidylinositol-Signalfusses nach IRA-Bestrahlung liefert die Abregulation der Phosphoinositid-3-Kinase (PIK3R3) (siehe Abb. 3.2 F). Für PIK3R3 wurde gezeigt, dass sie eine wichtige Rolle in der epidermalen Homöostase und Reparatur spielt (Pankow *et al.*, 2006). Neben diesen fünf hier aufgeführten Genen liefern die Microarraydaten zusätzliche Unterstützung für die Beteiligung von Calciumflüssen und zugehörigen Signalprozessen, denn IRA verändert die Expression von weiteren Genen, die (i) für die Bindung von Calcium, und dem (transmembranen) Calciumtransport zuständig sind: Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2 (CCL2), Ca^{2+} -transportierende ATPase (ATP2B4), Casein beta (CSN2) oder Calponin 1 (CNN1) (siehe Tabelle 3.2); (ii) Gene, die eine Rolle im Phosphat-Metabolismus und der Phosphat-abhängigen Signaltransduktion spielen: Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase, Typ I, beta (PIP5K1B), Tachykinin Rezeptor 1 (TACR1), Phosphatidylserinrezeptor (PTDSR), Proteintyrosinphosphatase Rezeptor (PTPRD) und die PI3Kinase (PIK3R3); oder (iii) andere aktive Transportsysteme, welche eine Verbindung zur Calcium-Homöostase aufweisen (Lamb *et al.*, 1999): so ist der Chloridionen-Kanal CLCN3 nach IRA-Bestrahlung aufreguliert.

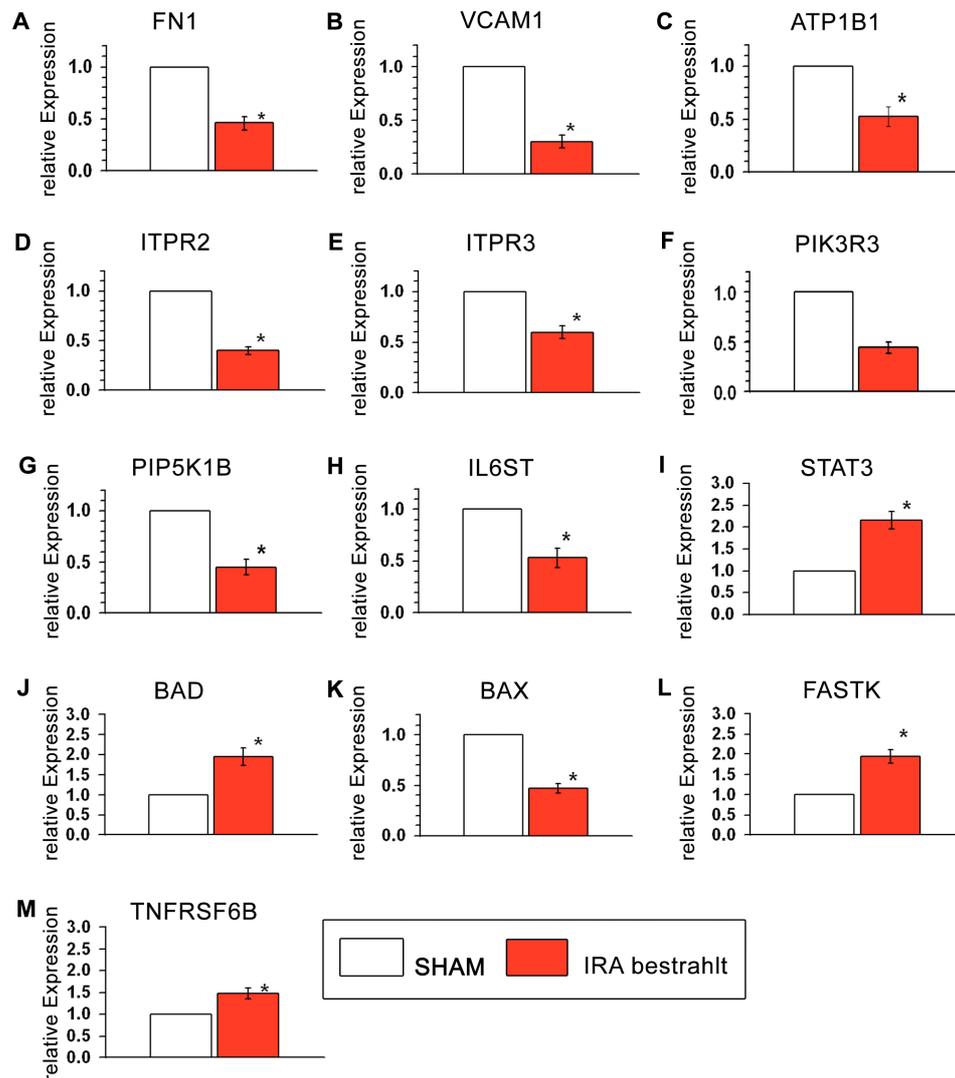


Abbildung 3.2: Realtime-PCR ausgewählter Gene nach IRA-Bestrahlung. Infrarot A-induzierte Genexpressionsänderungen von aus den 4 Kategorien ausgewählten Genen, gemessen mittels realtime PCR. Für jedes Gen wurden die relativen mRNA-Level entsprechend zur 18S rRNS-Transkriptmenge normalisiert, welches als *housekeeping*-Gen betrachtet wurde. Die differentielle Expression nach IRA (rote Balken) im Vergleich zu den auf den Faktor 1 gesetzten entsprechenden *sham*-Kontrollen (weisse Balken) sind für die ECM Gene FN1 (A) und VCAM-1 (B), für die Gene ATP1B1 (C), ITPR2 (D), ITPR3 (E), PIK3R3 (F) und PIP5K1B (G) aus dem Calcium-Signalweg, für die zum Stress-Signalfuss gehörenden Gene IL6ST (H) und STAT3 (I), sowie für die Apoptose-regulierenden Gene BAD (J), BAX (K), FASTK (L) und TNFRSF6B (M) aufgeführt. Die Fibroblasten wurden mit 860 J/cm^2 IRA bestrahlt und 24 h nach der Bestrahlung geerntet. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von wenigstens 9 unabhängigen Experimenten. * Signifikant unterschiedlich zur entsprechenden *sham*-Kontrolle ($p < 0.05$).

3.4 Stress-Signalwege

Bisherige Publikationen über den IRA-Effekt legen nahe, dass die zelluläre Antwort darauf Stress-Signalwege einhält (Shibata *et al.*, 2008; Schieke *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen stehen viele der mittels Microarray-Technik identifizierten IRA-regulierten Gene in enger Beziehung zu Stress-Signalpfaden oder sind sogar ein Teil von diesen. Die Analyse der Arraydaten unter dem Aspekt des Stress-Signalfusses lieferte 21 IRA-regulierte Gene, die einen Bezug zu dieser Kategorie aufwiesen. Für diese Gruppe von Genen wurden ebenfalls in neuen und zusätzlichen Experimenten die Expression zweier Gene nach IRA mittels *realtime*-PCR überprüft. Die verminderte Expression des *interleukin 6-signaltransducer* (IL6ST) wurde durch diesen unabhängigen Ansatz bestätigt, ebenso wie die erhöhte Expression des *transcription-factor-signaltransducer-and-activator-of-transkription-3* (STAT3) (siehe Abb.3.2 H und I). Innerhalb der IRA-regulierten Gene wurden weiterhin Gene der zellulären Immunantwort gefunden, z.B. Interleukine (IL12B, IL16) und Chemokin-Liganden (CCL2, CX4CL1, CXCL6, CXCL9). Diese sind dafür bekannt, andere Signalwege zu beeinflussen, so wie z.B. der IRA-regulierte Chemokin-Ligand 2 (CCL2), der sowohl die STAT3-Kaskade als auch die Calcium-Homöostase beeinflusst (Sakamoto *et al.*, 2007; Biswas & Sodhi, 2002; Kok *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse gehen konform mit der erst kürzlich beschriebenen Beteiligung von Interleukinen und Chemokin-Liganden am anti-inflammatorischen Effekt von IRA, z.B. angewandt in der Therapie von rheumatoider Arthritis (Shibata *et al.*, 2008). Darüber hinaus beobachteten Shibata *et al.* (2008) eine Beteiligung des NF- κ B Signalweges am anti-inflammatorischen Effekt von IRA. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Analysen identifizierten IRA-regulierte Gene, die in Bezug zu NF- κ B stehen (CARD10, TLR4, IKBKG). Unter den IRA-regulierten Genen, die sich in der Stress-Signalfuß Kategorie befinden, sind auch solche, welche eine Rolle in der antioxidativen Verteidigung der Zelle spielen, jedoch ohne dass hierbei ein konsistentes Regulationsmuster erkennbar wäre; während das im ER-lokalisierte, eine Thioredoxin-Domäne enthaltene Protein 4 (TXNDC4), das nach IRA aufreguliert ist, zu mehr antioxidativer Kapazität führen würde, ist die Gamma-Glutamyltransferase 1 (GGT1) abreguliert, was die antioxidative Verteidigung vermindert.

3.5 Regulation der Apoptose

Es wird diskutiert, dass IRA mit apoptotischen Prozessen der Zelle wechselwirkt. IRA-Strahlung vermittelt einen anti-apoptotischen Effekt, obwohl zunächst frühe Apoptose-Ereignisse initiiert werden (Menezes *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2004, 2006; Jantschitsch *et al.*, 2008). Die Microarray-Daten unterstützen diese Ergebnisse: Es wurden 11 Gene mit einem Bezug zur Apoptose durch IRA reguliert gefunden. Zur Bestätigung der Array-Daten wurden vier Gene ausgewählt und ihre veränderte Expression nach IRA-Behandlung in neuen, unabhängigen Experimenten mittels *realtime*-PCR untersucht. Tatsächlich bestätigten die wiederholten Bestrahlungs-Experimente die Microarray-Befunde in allen Fällen. BAD, der BCL2-Zelltod-Antagonist, zeigte eine erhöhte Expression nach IRA, während die Expression des BCL2-assoziierten X-Proteins (BAX) vermindert war (siehe Abb. 3.2 J und K). Beide Gene dienen als pro-apoptotische Aktivatoren durch die Bindung von BCL-2, dessen Zelltod-Repressor-Aktivität hierdurch umgekehrt

wird. Auch BAX ist eng mit den IRA-beeinflussten Calcium-Signalwegen quervernetzt. BAX reguliert den Phosphoinositol-Rezeptor und somit den Calcium-Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum (Oakes *et al.*, 2005). Die Expression der FAST-Kinase (FASTK) und des Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie-6-Köders (TNFRSF6B) konnte in beiden Fällen durch die *realtime*-PCR Experimente als aufreguliert nach IRA bestätigt werden (siehe Abb. 3.2 L und M). TNFRSF6B fungiert als Köder-Rezeptor, der mit den Zelltod Rezeptoren um Ligandenbindung in Wettbewerb steht, und daher anti-apoptotisch wirkt. TNFRSF6B ist stark exprimiert in Krebszellen, wo es die Aufregulation von IL-8 und Adhäsionsmoleküle wie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) bewirkt (Yang *et al.*, 2005). FASTK ist ein Überlebensprotein, das die UV-induzierte Apoptose inhibiert (Li *et al.*, 2004). Die Aufregulation von FASTK durch IRA-Bestrahlung trägt somit vermutlich ebenfalls zum anti-apoptotischen Effekt bei.

3.6 Einfluss der zellulären IRA-Antwort auf die Proteinexpression

Um zu untersuchen, ob sich die IRA-induzierten Veränderungen auf Ebene der Genexpression auch auf die Proteinexpression auswirken, wurden mittels Western Blot-Technik exemplarisch die Expression von transkriptionell IRA-regulierten Genen (ITPR3, PI3K und STAT3) zusätzlich auf der Proteinebene analysiert. Hierfür wurden Zellen mit einer Dosis von 860 J/cm^2 IRA bestrahlt und Gesamtzell-Lysate direkt nach der Bestrahlung, sowie 12 h, 24h, 48h und 72h später geerntet und mittels spezifischer Antikörper die relative Proteinmenge im Vergleich zur entsprechenden sham-behandelten Kontrollprobe verglichen. In Analogie zu den *realtime*-PCR-Experimenten kommt es auch hier im zeitlichen Verlauf zu einer Abnahme der Proteinmenge von ITPR3 und PI3K, sowie zu einer Zunahme der STAT3-Proteinmenge bei den IRA-bestrahlten Proben (siehe Abb. 3.3). Darüberhinaus lässt sich bei STAT3 nach IRA-Bestrahlung eine Bandenverschiebung beobachten, was für eine posttranslationale Proteinmodifikation in Folge der IRA-Bestrahlung sprechen könnte.

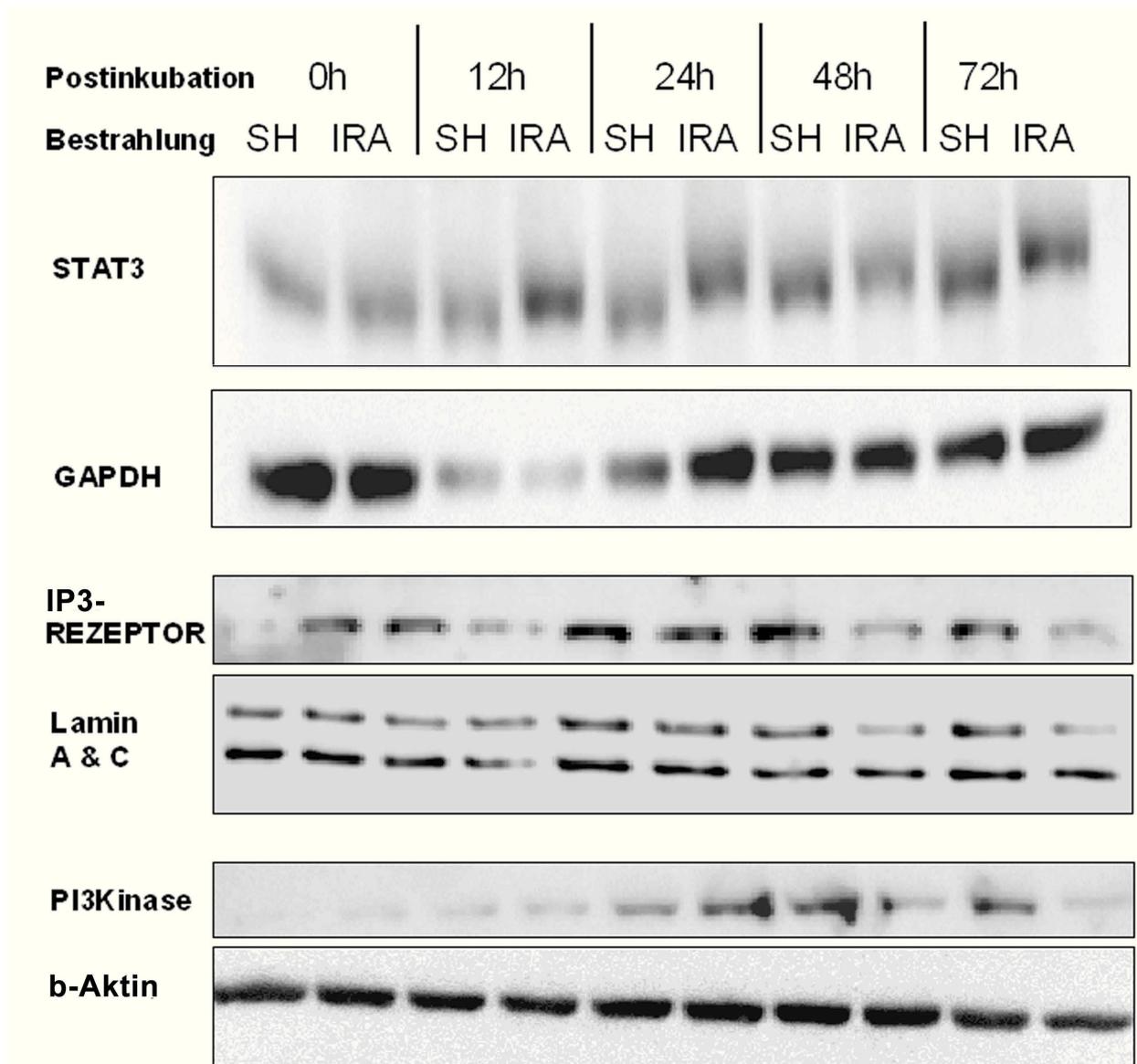


Abbildung 3.3: Western-Blot ausgewählter Proteine nach IRA-Bestrahlung. IRA-induzierte Veränderungen der Genexpression manifestieren sich auch auf der Proteinebene. Western-Blots mit Zeitreihen von Proteinlysaten aus *sham*- und IRA-bestrahlten (860 J/cm^2), primären dermalen humanen Fibroblasten wurden direkt (0h), 12h, 24h, 48h und 72h nach der IRA-Bestrahlung) geerntet und immundetektiert mit spezifischen Antikörpern gegen den IP₃-Rezeptor, die PI3Kinase und STAT3-Gesamtprotein. Als Ladekontrolle dienten je nach Proteingröße Lamin A+C, Aktin und GAPDH. Die Daten sind eine repräsentative Abbildung von zwei verschiedenen Experimenten.

3.7 Die zelluläre IRA-Antwort läuft über verschiedene Signalwege

Um die zelluläre Antwort auf IRA weiter aufzuklären, wurden die möglicherweise beteiligten Signalwege analysiert, indem spezifische Inhibitoren für die in Verdacht stehenden Signaltransduktionspfade eingesetzt wurden, so dass ihr Einfluss auf die IRA-induzierte Regulation der Genexpression untersucht werden konnte. Die Resultate bestätigen, dass IRA mehrere Signalwege in humanen dermalen Fibroblasten beeinflusst. MAPKinase Signalfluss über ERK1/2 wurde bereits als funktional relevant für die IRA-bedingte Änderung der MMP-1-Expression beschrieben (Schieke *et al.*, 2002). Mit den hier dargestellten Experimenten ließ sich bestätigen, dass ERK1/2 ein wichtiger Faktor in der zellulären IRA-Antwort ist, da sich die Regulation durch IRA bis auf zwei Ausnahmen in allen untersuchten Genen als ERK1/2-abhängig darstellte. Die Verwendung von PD98059 (siehe Abb. 3.4 A, D, G und J), einem wirkungsvollen Inhibitor von MEK1/2, die in diesem Signalweg direkt oberhalb von ERK1/2 gelegen ist, setzte die IRA-abhängige Veränderung der Genexpression von fast allen untersuchten Genen ausser Kraft (ATP1B1, BAX, BAD, FASTK, FN1, ITPR3, IL6ST, PIK3R3, PIK5K1B, STAT3, TNFRSF6B) mit Ausnahme von FN1 und VCAM-1.

Die MAPKinase p38 wird als Reaktion auf IRA-Bestrahlung phosphoryliert (Schieke *et al.*, 2002), doch die Rolle in der Veränderung der IRA-induzierten Genantwort ist bisher nicht weiter untersucht worden. Der Einsatz des p38-Inhibitors SB203580 (siehe Abb. 3.4 A, D, G und J) führt zu einer Änderung der Expression von beinahe allen untersuchten IRA-modulierten Genen (ATP1B1, BAX, BAD, FASTK, ITPR3, IL6ST, PIK3R3, PIK5K1B, STAT3, TNFRSF6B, VCAM-1) bis auf Fibronectin (FN1) als einzige Ausnahme.

Die JNK- und ERK-Signalwege führen in Kombination zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher als Hauptaktivator des MMP-1-Promotors bekannt ist (Borden & Heller 1997). Inhibierung von JNK mittels SP600125 (Abb. 3.4 A, D, G und J) führte zu einer Veränderung in der IRA-Regulation von 8 Genen: BAD, FASTK, FN1, IL6ST, ITPR3, PIK3R3, STAT3, TNFRSF6B, während die von IRA-bedingte Regulation von 4 Genen unbeeinflusst blieb (ATP1B1, BAX, PIK5K1B, VCAM-1).

Die hier gewonnenen Daten zu einer Beteiligung des Calcium- und IP3-Signalflusses in der zellulären IRA-Antwort, veranlasste dazu, diese Signalwege mit zwei Ansätzen zu untersuchen. Die PI3Kinase wurde unter Verwendung von LY284002 inhibiert, zur Inhibierung der Calcium-induzierten Signale wurde Cyclosporin A dem Medium vor und nach IRA-Bestrahlung hinzugegeben. Die Blockade der PI3Kinase mit LY294002 (siehe Abb. 3.4 B, E, H und K) verändert den IRA-Effekt der meisten analysierten Gene (BAX, BAD, FASTK, FN1, ITPR3, IL6ST, PIK3R3, PIK5K1B, STAT3, VCAM-1) bis auf TNFRSF6B und ATP1B1. Behandlung mit Cyclosporin A (siehe Abb. 3.4 B, E, H und K) hatte einen weitreichenden Einfluß auf die IRA-induzierte Genexpression der in den Experimenten untersuchten Gene. Interessanterweise verhielt sich nur die IRA-induzierte Abregulation von PIK3R3 unverändert bei Cyclosporin A-Zugabe.

Der vierte Bereich der Signal-Komplexe, der analysiert wurde, war die IL6-Signalkaskade. Der Einsatz eines Inhibitor-Peptids für STAT3 (siehe Abb. 3.4 F, I und L) moduliert die IRA-induzierten Veränderungen der Genexpression für viele (ATP1B1, BAX, BAD, FASTK, FN1, PIK5K1B, STAT3, TNFRSF6B, VCAM-1), aber nicht alle untersuchten Gene, da die Regulation von IL6ST, ITPR3 und PIK3R3 unverändert blieb. Wie in Tabelle 3.3 zusammengefasst, zeigen die Ergebnisse, dass IRA tief in die zellulären Signal-

3.7 Die zelluläre IRA-Antwort läuft über verschiedene Signalwege

transduktionswege eingreift. Die Regulation von drei der zwölf untersuchten Gene (BAD, FASTK, STAT3) war von der Inhibierung jeder der untersuchten Signalwege betroffen.

Tabelle 3.3: Einfluss von Signalwegen auf die IRA-induzierte Genexpression. Überblick über die Beteiligung verschiedener Signalwege in der durch IRA hervorgerufenen Genregulation. Die Behandlung einer Probe mit entsprechendem Inhibitor, welche die IRA-abhängige Genexpression aufhebt ist mit + markiert. IRA-abhängige Modulation der Genexpression, die von der Inhibitorbehandlung unabhängig war, ist mit - markiert.

Inhibierung des IRA-Effekts durch						
regulierte Gene	ERK-Inhib. PD98059	MAPK p38-Inhib. SB203580	JNK-Inhib. SP600125	CALCIUM PI3K-Inhib. LY284002	Cyclosporin A	STAT3 Inhib.-Peptid
ECM						
FN1	-	-	+	+	+	+
VCAM1	-	+	-	+	+	+
Calcium						
ATP1B1	+	+	-	-	+	+
ITPR3	+	+	+	+	+	-
PIK3P3	+	+	+	+	-	-
PIP5K1B	+	+	-	+	+	+
Stress						
IL6ST	+	+	+	+	+	-
STAT3	+	+	+	+	+	+
Apoptose						
BAD	+	+	+	+	+	+
BAX	+	+	-	+	+	+
FASTK	+	+	+	+	+	+
TNFRSF6B	+	+	+	-	+	+

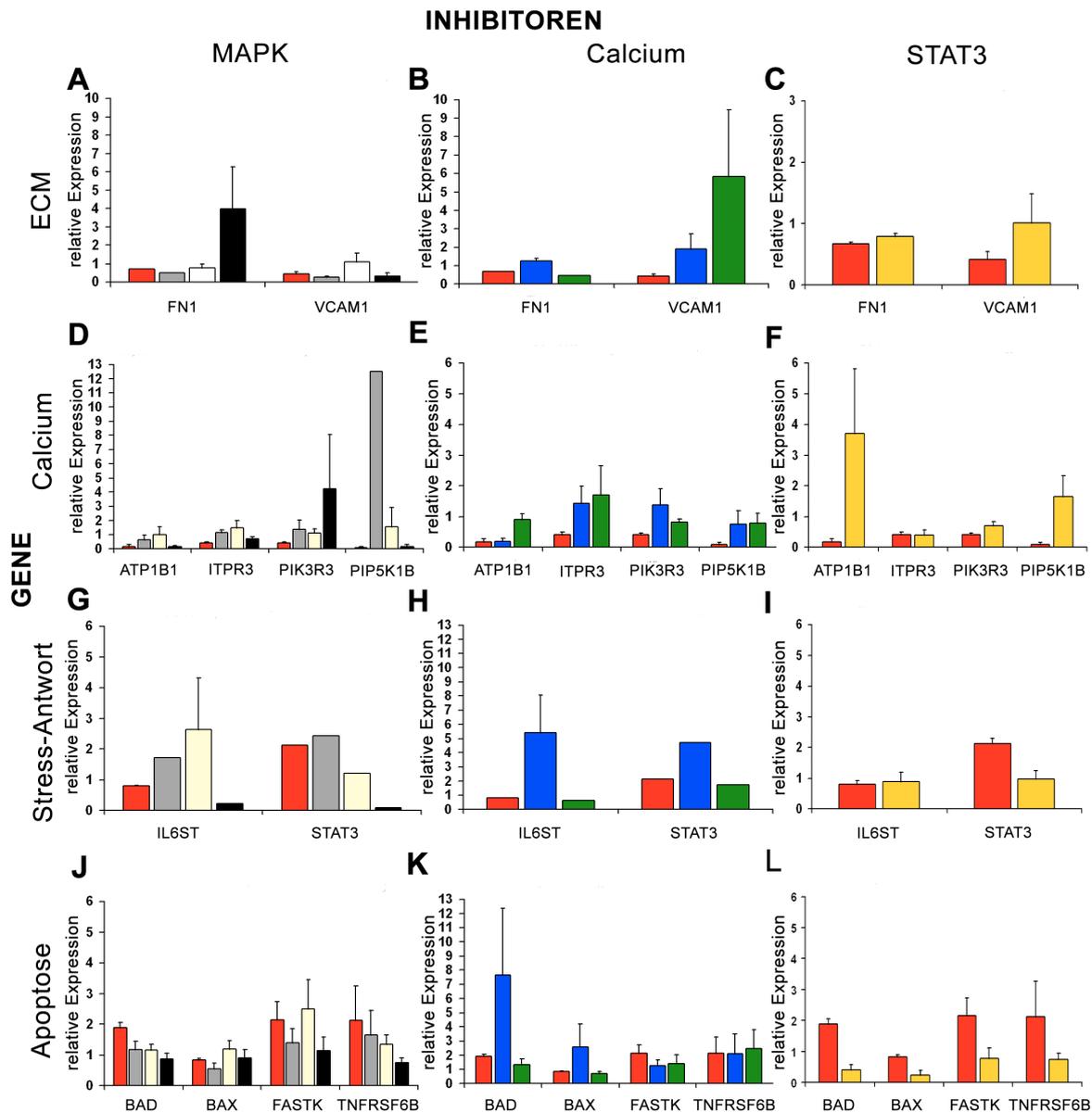


Abbildung 3.4: Kinase-Inhibitoren greifen differentiell in die IRA-induzierte Genexpression ein. Messungen der mRNS der hier aufgeführten Gene 24 h nach IRA-Bestrahlung (860 J/cm^2) in Zell-Lysaten, die mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt oder nicht behandelt (rote Balken) wurden. Die Expression der ECM-Gene (A bis C), der Gene des Calcium-Signalweges (D bis F), der Stressantwort-Gene (G bis I) und der Apoptose-Gene (J bis L) wurde nach IRA-Bestrahlung kombiniert mit Inhibitorbehandlung analysiert. Die Zellen wurden entweder mit $20 \mu\text{M}$ ERK1/2-Inhibitor PD98059 (graue Balken in A, D, G, J), $10 \mu\text{M}$ p38-Inhibitor SB203580 (weisse Balken A, D, G, E) $4 \mu\text{M}$ JNK-Inhibitor II SP600125 (schwarze Balken, A, D, G, J), $20 \mu\text{M}$ PI3K-Inhibitor LY294002 (blaue Balken, B, E, H, K) $1 \mu\text{M}$ Cyclosporin A (grüne Balken, B, E, H, K), oder $25 \mu\text{M}$ STAT3-Inhibitor-Peptid (gelbe Balken, F, I, L) 1 Stunde vor und 24 h nach der Bestrahlung behandelt. Die Daten sind Mittelwerte oder Mittelwerte \pm SEM.

3.8 Der Einfluss von ROS in der IRA-induzierten Genregulation

Bisherige Studien zeigten, dass die Bildung von ROS ein frühzeitiger Effekt der IRA-Bestrahlung ist und dass diese erhöhte Belastung der Zellen mit ROS funktional relevant ist für den IRA-Effekt auf die MMP-1-Expression (Schroeder *et al.*, 2007). Die Verwendung von Antioxidantien verringert die Aufregulation von MMP-1 nach IRA-Bestrahlung und reduziert den Phosphorylierungs-Status der MAP-Kinasen ERK1/2, die am retrograden mitochondrialen Signalfluss beteiligt sind (Schroeder *et al.*, 2007, 2008b). Hier wurde nun untersucht, wie eine Vorbehandlung der Fibroblasten mit zwei verschiedenen Antioxidantien die IRA-Effekte beeinflusst. N-Acetyl-Cystein (NAC), ein Cystein-Donor erhöht den intrazellulären Glutathion-Level und erhöht somit in Folge die antioxidative Verteidigung der gesamten Zelle (Schroeder *et al.*, 2007), während MitoQ, ein Chinon, welches sich zielgerichtet in den Mitochondrien anlagert und dort spezifisch ROS, die in den Mitochondrien entstehen, abfängt (Tauskela, 2007).

Eine Verstärkung der antioxidativen Verteidigung der Zellen über die Präinkubation mit NAC wirkt dem IRA-Effekt bei allen zwölf untersuchten Genen entgegen (siehe Abb. 3.5). Interessanterweise führte die Verwendung von MitoQ nicht zu solch einem umfassenden Schutz, die IRA-bedingte Regulation in der Genexpression von FN1, ATP1B1, IL6ST und BAX wurden durch MitoQ nicht gegenteilig verändert. Die IRA-bedingte Abregulation der FN1- und IL6ST-Expression wurde sogar noch verstärkt (siehe Abb. 3.5A und C).

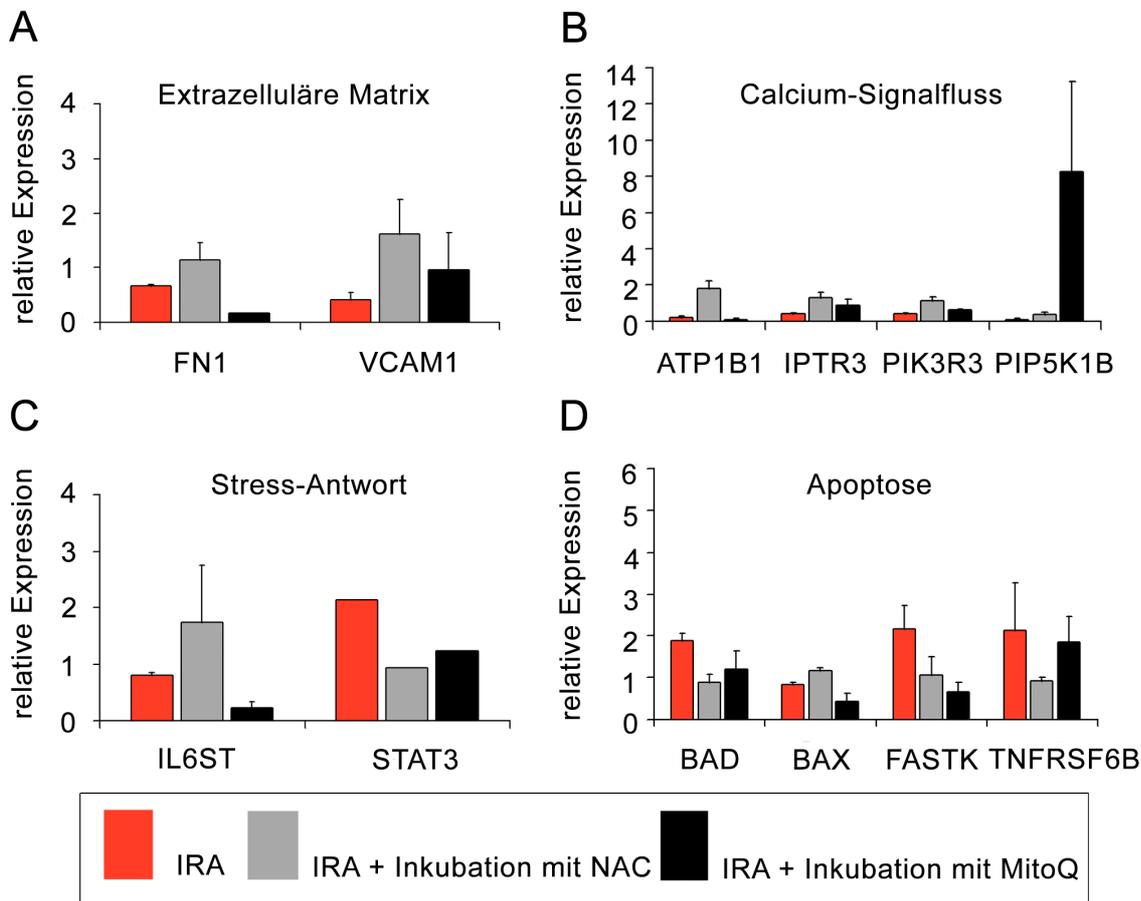


Abbildung 3.5: Einfluß der Inkubation mit Antioxidantien auf die IRA-induzierte Genregulation. Antioxidantien verändern die IRA-induzierte Genexpression. Messung des relativen mRNA-Gehaltes der aufgeführten Gene 24h nach IRA-Bestrahlung (860 J/cm^2) in Lysat von Zellen, die mit 20 mM N-Acetylcystein (NAC) (graue Balken), 100 nM MitoQ (schwarze Balken) oder ohne Antioxidantien-Zugabe (rote Balken) 24h vor und nach der Bestrahlung behandelt wurden für Gene der extrazellulären Matrix (A), des Calcium-Signalweges (B), der Stressantwort (C), und der Apoptose-Regulation (D). Die Daten sind Mittelwerte oder Mittelwerte \pm SEM.

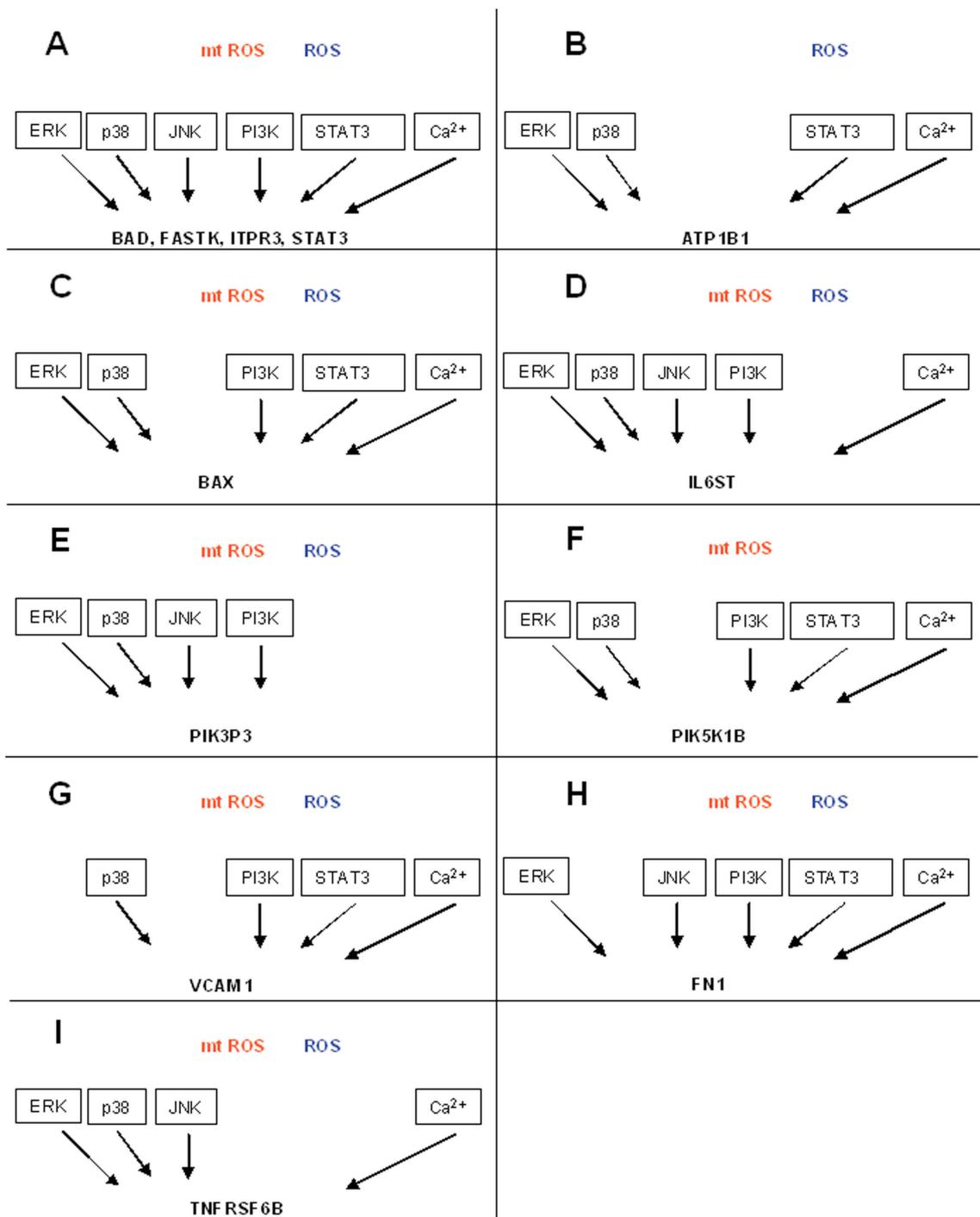


Abbildung 3.6: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und unterschiedliche Signalwege sind involviert in die IRA-induzierte Regulation der Genexpression. Zusammenfassung der Ergebnisse abgeleitet aus den Inhibitor- und Antioxidantien-Versuchen aus den Abbildungen 3.4 und 3.5. mtROS (rot) zeigt, dass aus dem Mitochondrium stammendes ROS eine Rolle im IRA-Signalweg spielt, die mit dem mitochondrialen Antioxidanz MitoQ unterbunden werden kann. ROS (blau), steht für den globalen Einfluss von ubiquitär in den Zellen auftretenden radikalen Sauerstoff-Spezies, falls diesen mit dem Antioxidanz NAC entgegengewirkt werden konnte. Durch unterschiedliche Signalwegkombinationen regulierte Gene und Gengruppen sind von A bis I gruppiert.

3.9 in silico-Promotor-Analyse der IRA-regulierten Gene

Als weiterer Schritt für einen tieferen Einblick in die Genregulation nach IRA-Behandlung wurden die Promotor-Regionen IRA-regulierter Gene nach Bindestellen von Transkriptionsfaktor-Kandidaten durchleuchtet, welche das Verständnis der Zusammenhänge zwischen den IRA-regulierten Genen und den beteiligten Signaltransduktionswegen erweitern können. Mit der unter Material & Methoden beschriebenen Herangehensweise konnte eine kleine Gruppe von Transkriptionsfaktor-Kandidaten für die IRA-Antwort ermittelt werden.

Die vorhergesagten DNS-Bindestellen dieser Faktoren waren zum einen bei IRA-regulierten Genen vorhanden. Zum anderen konnte man die Bindestellen dieser Faktoren auch noch in der *absent*-Gruppe finden. Bei der *absent*-Gruppe handelt es sich um Gene, die in Fibroblasten im Normalzustand nicht aktiv sind, oder um Gene, die aufgrund von zu geringer Transkriptions-Aktivität auf den Microarrays nicht zu detektieren waren und daher keine Aussage über ihre IRA-Regulierbarkeit getroffen werden konnte. Die transkriptionsfaktor-Bindestellen sind somit nur bei IRA-regulierten Genen (a), unabhängig vom IRA-Stimulus dauerhaft nicht exprimierten Genen (b) und bei Genen, bei denen man keine Aussage über die IRA-Regulierbarkeit treffen kann, vorzufinden.

Im Gegensatz dazu kommen die in den oben genannten Gruppen vorkommenden Bindestellen nicht in der *present*-Gruppe vor, die aus dauerhaft exprimierten, aber von IRA-nicht-beeinflussten Genen besteht. Somit kommen die zugehörigen Transkriptionsfaktoren für eine Beteiligung in der IRA-Genantwort in Frage.

Die Häufigkeitsverteilungen der auffälligen Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind in Tabelle 3.4 und Abbildung 3.7 dargestellt, die Häufigkeitsverteilung aller PTFs in den Gruppen findet sich im Anhang unter 9.2.

Tabelle 3.4: IRA-spezifische Transkriptionsfaktor-Bindestellen Aufgeführt sind die Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit einer spezifischen Verteilung zwischen den vier Gen-Gruppen.

Transkriptionsfaktor	PTF-AUF	Häufigkeit AB	keiten ABSENT	PRESENT	Konsensus-Bindestellen	Gene AUF	Gene AB	Gene ABSENT	Gene PRESENT
PTFs nur in den AUFREGULIERT, ABREGULIERT und ABSENT Gruppen vorhanden									
ZIC2.01	11	14	16	0	GGGGTGGTC	PPAT IKBKG CYP3A4 GEMIN4 COL1A1 LRP8 B3GNT1 MCRS1	GAMT APP C19orf6 PMVK VCAM1 GRIN2C USP5 FAF1 GCAT CDK5 TACR KIF2C PSCD4 Hs468490 LHCGR	ATP6VOC MAP4 MPRS18B LAMC2 CLDN7 NDST1 OAS1 MDC1 CDH15 LPL36AL COL5A1 S100A9 CDK10 ACTN2 C12orf2 KCTD17	

3.9 in silico-Promotor-Analyse der IRA-regulierten Gene

Transkriptionsfaktor	PTF-AUF	Häufigkeit AB	Häufigkeit ABSENT	Häufigkeit PRESENT	Konsensus-Bindungsmotiv	Gene AUF	Gene AB	Gene ABSENT	Gene PRESENT
USF_C	27	19	31	0	GCACGTGG	STAT3 PPAT MGC29875 VAMP2 ARD1 HES1 MAFF ADRB2 GOT1 ABCC3 MVK 8D6A PCA CA LRP8 TIAM1 SOAT1 RERE RPC32 TOLLIP TIMM10 DAXX SPON1 PELP1 MUC1 AKAP1 CGI-63 KIAA0409	GAMT CDH10 RPC32 APP C1orf33 NUP98 GRIN2C GALNT2 HKE2 AK3 HHEX MAP2K7 CDK5 PAO_SMOX EHD1 GART PSCD4 SBB126 KLHL7 SCAMP1	APEH DUSP3 EFNA1 CRMP1 IKBKAP CLDN7 POLR2L UMPS PER1 SERPINA1 STAT5A TGFB1 PTK2B LGALS9 NOTCH3 ARRB2 HES1 ARID4A CDK10 THBD HBA1 MFNG PDE2A ZNF202 C11orf13 KIAA0971 MGC20875 FLJ20097 POFUT2 c11orf10 MGC3113	
CREBTF_Q6	10	18	14	0	TGACGTCAC	STAT3 VAMP2 MAFF BTG3 MVK CLCN3 ARG2 PFAS HIST1H4H ZFP36L1	CD2AP FN1 ELOVL5 FLJ10581 RNMTL1 KIAA0674 C19orf6 IFRD1 SLC31A1 NUP98 SKIL ATP1B1 CNN1 AP2B1 SF1 B4GALT4 WHSCIL1 HS3ST3A1 Hs.293563 FLJ12666	ATP6VOC DUSP1 TM4SF2 HCFC1 HTF9C IKBKAP CLDN7 UMPS PER1 MEF2D ARF4L THBD GPSM ZZEF1	
TCF1P_Q6	7	7	9	0	AACCCGAC	FLJ21172 MAFF 8D6A HGMA1 RHEB AP-BA2BP ZFP36L1	IGF1R APP HIST1H2BD GRIN2C GALNT2 BT-BEB1_KLF9 EIF5A	RAB6A BST2 RHEB CDH3 LAD1 KLF9 CDH163 RBM19 POFUT2	
CREBP1_Q1	5	7	4	0	TTACGTAA	PPAT VAMP2 MASP1 TUB-GCP5 ZFP36L1	IL6ST INHBC TLR4 AK3 ZW10 BT-BEB1_KLF9 EIF5A	PER1 KLF9 VSNL1 T3JAM	
POU1F1_Q6	13	17	0	0	ATGAATAAAT	PPAT AND-1 GPD2 SFRS8 8D6A FOS KIAA0116 EXOSC7 RPC32 JAK1 SPON1 AP-BA2BP CDV-1 LOH11CR2A	CDH10 RPC32 IFRD1 TCEB1 VCAM1 ATP7A SGPL1 C8orf1 HFE PPM1G BTBEB1 KLF9 DNAJC8 FLJ23142 SCRN3 FLJ23142 C18orf9 15E1.2		
PTFs nur in den AUFREGULIERT und den ABSENT Gruppen vorhanden									
EGR_Q6	6	0	5	0	GTGGGGGCGAC	GATA6 CIZ1 GEMIN4 RRP41 JAK1 PELP1		HCFC1 TN-FAIP2 STK10 ARRB2 MGC3113	
GATA1_Q5	7	0	7	0	TGTTATCAGC	IKBKG DLK1 RFX5 HES1 ITGA10 TIAM1 TOLLIP		CDH1 LPL36AL HES1 CDK10 FANCA THBD ZNF42	

3 Ergebnisse

Transkriptionsfaktor	PTF-AUF	Häufigkeit AB	keiten ABSENT	PRESENT	Konsensus-Bindungsmotiv	Gene AUF	Gene AB	Gene ABSENT	Gene PRESENT
PTFs nur in den ABREGULIERT und den ABSENT Gruppen vorhanden									
AP4_Q6	0	7	10	0	CACAGCTGGT		FN1 IFRD1 MAP2K7 TCFL4 MLX FLJ21106 BAX BCOR	DUSP1 PRG1 HCFC1 CLDN7 ITM2A PDGFRB ARID4A HPGD ELF3 EFNA1	
MYB_Q3	0	7	9	0	CAACTGACCCT		IGF1R C14orf133 USP5 USP39 ACTC ROD1 Hs468490 LHCGR	MAP4 PO-DXL TN-FAIP2 NINJ1 ARHGEF1 PDGFRB NFYA C11orf13 MGC33214	
HELIOSA_02	0	9	0	0	TTTTTCCTTAA		KLF5 GALNT2 C8orf1 GCAT AP2B1 ITIH5 ROD1 FLJ23142 SCRN3 15E1.2		
PTFs nur in der ABSENT Gruppe vorhanden									
LEF1_Q6	0	0	13	0	CCCTTTGAAG			NMT1 MY-BL2 ND-FUA2 SEL1L VAMP8 ITM2A PPP2R1B NOTCH4 COL5A1 S100A9 NFKBIE C12orf2 MGC3113	
NFMUE1_Q6	0	0	11	0	AGATGGCCG			DUSP1 RAB6A STAT5A LSP1 FANCA NFYA GPSP KCTD17 ZZEF1	
USF_Q6	0	0	6	0	GCCACGTGAC			ATP6VOC PER1 ACTN2 CLCN6 UROS RBM19	
PTFs nur in der PRESENT Gruppe vorhanden									
GATA6_01	18	19	0	22	AAAGATAAGG	PPAT FLJ21172 LDLR HES1 AND-1 MRE11A MASP1 PPP2R4 PCCA NKX3-1 CXCL6 APC10 ANAPC10 POLR1C TIMM10 NPAT CNNM2 LOH11CR2A ZFP36L1	PTPN14 SMC4L1 ZNF228 C19orf6 IFRD1 ATP7A KLF5 SLC19A2 NUP98 CSNK2A1 C8orf1 TOX SAS BAX PREP NPTX2 RNF146 dactylidin ZFX		
TATA_C	0	16	0	12	GCTATAAAAG		FLJ21168 KIAA0674 C14orf133 RBBP2 SLC31A1 HIST1H2BD EFNB2 HHEX ZW10 PPIG EGFR GEMIN6 DVS27 C9ORF26 ANP32E FLJ22087 ABC1 15E1.2	TALGN PIGV DDX5 RHOA HSPCB PTTG1IP LAPTM4A HSPA98 MA-PRE1 SCRNI C14orf92	
SP1_Q4_01	0	0	0	5	GGCCCCGCCCOCT				FLJ14154 CFL1 ARF1 KARS KIAA0152

3.9 *in silico*-Promotor-Analyse der IRA-regulierten Gene

Transkriptionsfaktor	PTF-AUF	Häufigkeit AB	Häufigkeit ABSENT	Häufigkeit PRESENT	Konsensus-Bindungsmotiv	Gene AUF	Gene AB	Gene ABSENT	Gene PRESENT
NFE2L3	0	0	0	6	TGCTGAGTCAC				HSPCB MATR3 LDHA SOD1 SPOCK2 HSPA9B
NRF1_Q6	0	0	0	8	CGCATGCGCA				CAPNS1 KHDRBS1 ABCF1 DAD1 SART1 LDHA ACTR1A MGC5508

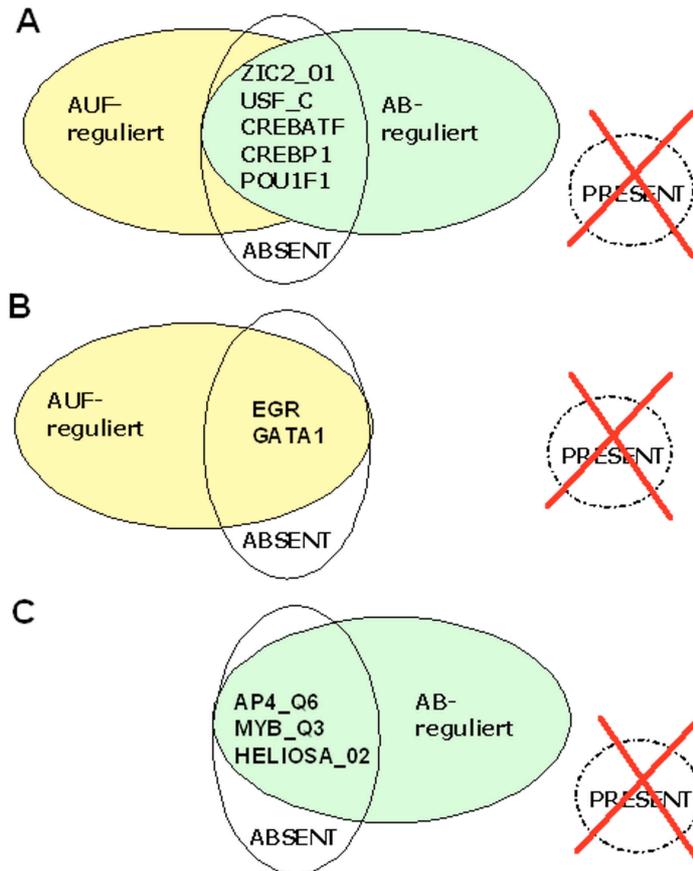


Abbildung 3.7: Transkriptionsfaktorkandidaten der IRA-Antwort. Die Kandidaten sind abgeleitet aus den Transkriptionsfaktorbindestellen (PTFs), die in keinem Fall in der nicht durch IRA-regulierten Kontrollgruppe von konstitutiv exprimierten Genen auftauchen. A) PTFs nur bei aufregulierten, abregulierten und *absent* Genen vorhanden. B) PTFs nur bei aufregulierten und *absent* Genen. C) PTFs nur bei abregulierten und *absent* Genen.

Die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren ZIC2_01, USF_C, CREBATF_Q6, TCF1P_Q6, CREBP1_01 and POU1F_Q6 wurden nur in den Gruppen von durch IRA auf- oder abregulierten Genen gefunden; darüber hinaus auch in der Gruppe von Genen, bei deren Auswertung der Arraydaten ein *absent call* ermittelt wurde. Die Bindestellen für EGR_Q6 und GATA1_05 konnten nur in der Gruppe mit Aufregulation und in der *absent call*-Gruppe gefunden werden. P4_Q6-, MYB_Q3- und HELIOSA_02-Bindestellen sind nur bei abregulierten- oder *absent*-Genen vorhanden (siehe Abb. 3.7). Darüber hinaus lieferte die *in silico*-Promotor-Analyse auch Bindestellen, die nur in der Gruppe der *absent*-Gene auftraten (LEF1_Q6, NFMUE1_Q6, USF_Q6) und es gab auch Transkriptionsfaktor-Bindestellen, welche nur in der Gruppe der nicht durch IRA-regulierten Gene, die dauerhaft exprimiert werden (*present call*), zu beobachten waren (GATA6_01, TATA_C, SP1_Q4_01, NFE2_01, NRF1_Q6).

USF-Transkriptionsfaktoren besitzen eine Rolle in der UV-induzierten Genantwort (Corre *et al.*, 2004) und sind Schlüsselregulatoren der Stress- und Immunantwort sowie von Zellzyklus und Proliferation; zelluläre Prozesse, die auch von IRA-regulierten Genen gesteuert werden. Darüber hinaus wird die Bindung von USF-Proteinen an die DNS von den Kinasen p38 und PI3K gesteuert (Corre *et al.*, 2004; Nowak *et al.*, 2005), beides wichtige Signalwege der IRA-Antwort, wie die Kinase-Inhibitor-Experimente zeigen. Die Promotor-Region des Transkriptionsfaktors STAT3 besitzt eine vorhergesagte USF_C-Bindungsstelle und die Inhibitorexperimente zeigten, dass die IRA-induzierte Expression von STAT3 durch p38- und PI3K-Inhibitoren moduliert werden kann.

Die Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie vermitteln die UVB-induzierte COX2-Expression, welche über den p38-Signalweg abläuft (Tang *et al.*, 2001). Für CREB-Faktoren wurden Bindestellen bei den IRA-regulierten Genen von STAT3, IL6ST und ATP1B1 gefunden. Die Regulation der Na⁺/K⁺-ATPase-alpha-1-Expression durch CREB über cAMP wurde auch in der Literatur beschrieben (LaPensee *et al.*, 2008).

Der Transkriptionsfaktor POU1, welcher ebenfalls mittels der p38 MAPKinase aktiviert wird (de Guise *et al.*, 2006), schützt vor apoptotischem Zelltod (Quentien *et al.*, 2006). POU1 könnte daher als Vermittler der antiapoptotischen Genantwort fungieren, welche nach IRA Bestrahlung auftritt. In der Promotor-Region des durch IRA-abregulierten Gens VCAM-1 findet sich eine vorhergesagte Bindungsstelle für POU1. Die Inhibitorexperimente (siehe Abb. 3.4) zeigen eine Abhängigkeit der IRA-Regulation von VCAM-1 über den p38-Weg, was die These einer VCAM-1-Regulation nach IR über den POU-Faktor unterstützen würde. Mutationen in diesem Transkriptionsfaktor stehen auch in Bezug zur Langlebigkeit in Mäusen (Holzenberger *et al.*, 2004), so dass eine durch IRA chronisch veränderte Aktivierung von POU1 ebenfalls Einfluss auf die Alterung der in diesem Fall betroffenen Fibroblasten nehmen könnte.

TCF-Transkriptionsfaktoren sind bekannt für ihre Rolle bei der Bildung von Tumoren (Roose & Clevers, 1999). Die Aktivierung von TCF1 wird verstärkt durch die Faktoren STAT3 und AP-1 (Leu *et al.*, 2001), die beide eine wichtige Rolle im Infrarot A-induzierten Signalfluß zu spielen scheinen, wie es die Daten dieser Arbeit und die Studien zur Aufregulation von MMP-1 (Schieke *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2007, 2008b) nahelegen.

Die oberhalb des EGR-Faktors gelegenen Signalwege beinhalten ERK1/2, Calciumionen, die PI3Kinase und Oncostatin M als Teil des IL6-/STAT3-Weges (Beidelschies *et al.*, 2008; Valdés *et al.*, 2007; Böing *et al.*, 2006). Zusätzlich zu der Verbindung mit diesen Signalwegen, die alle an der IRA-Antwort beteiligt sind, ist EGR auch an der ROS-Bildung

beteiligt und induziert die ROS-abhängige Inhibierung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität (Bek *et al.*, 2003), die als Gen selbst durch IRA transkriptionell reguliert ist.

GATA1 ist involviert in die Zellzyklus-Regulation (Dubart *et al.*, 1996) und die Expression dieses Faktors steht in Abhängigkeit von ROS (Nagata *et al.*, 2007) und eine direkte Bindung an STAT3 wurde beschrieben (Ezoe *et al.*, 2005). Somit würde sich GATA1 als IRA-induzierter Transkriptionsfaktor gut in das Gesamtbild der zellulären Antwort einfügen.

Für die Myb-Transkriptionsfaktoren wurde eine Beteiligung in Wundheilungsprozessen beschrieben (Kopecki *et al.*, 2007). Der Faktor b-Myb fungiert als Repressor des Matrixgens COL1A1 (Cicchillitti *et al.*, 2004). Für c-Myb ist die Steuerung der Degradation über die p38-MAP-Kinase beschrieben (Pani & Ferrari, 2008) und darüber hinaus reguliert c-Myb die Transkription des Inositolphosphat Rezeptors Typ 1 (Afroze *et al.*, 2007). Somit lässt sich auch für die Myb-Transkriptionsfaktoren sagen, dass im Vergleich der Prozesse, an denen Myb beteiligt ist und den Genen, die Myb reguliert, mit den Effekten und regulierten Genen von IRA Übereinstimmungen zu verzeichnen sind, so dass es sich auch bei Myb um einen aussichtsreichen Transkriptionsfaktor-Kandidaten, der an der IRA-Antwort beteiligt sein könnte, handelt.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Reaktion von Fibroblasten verschiedener Spender auf IRA

Der Vergleich der gesamten Expressionsprofile von verschiedenen IRA-bestrahlten Fibroblastenzellen mitsamt entsprechender *sham*-Kontrollen von verschiedenen Spendern mittels hierarchischem *Clustering* deutet auf stark interindividuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern hin, die auch den Effekt von IRA beeinflussen. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, dass verschiedene Individuen nicht gleich auf den IRA-Stimulus reagieren (Schroeder *et al.*, 2008b). Die Veränderungen in der Genexpression, welche durch IRA induziert werden, hat die selbe Größenordnung, wie es für andere Strahlungsarten gegenüber Fibroblasten gezeigt wurde (Boerma *et al.*, 2006). Somit sollte IRA in Analogie zur UV-Strahlung sowohl vom genregulatorischen Potential betrachtet, als auch von der alltäglichen Exposition durch den großen Anteil von IRA im natürlichen Sonnenlicht (siehe Abschnitt 1.1) her gesehen, als eine relevante Noxe betrachtet werden, die zu substantiellen Veränderungen in der Genexpression von Haut-Fibroblasten führen kann.

4.2 Einfluss von IRA auf die extrazelluläre Matrix

Es ist gezeigt worden, dass das Matrixprotein Fibronectin 1 auch in gealterten humanen dermalen Fibroblasten vermindert exprimiert wird (Molinari *et al.*, 2008), und dies ebenfalls in lichtgealterten HaCat Zellen der Fall ist (Lee *et al.*, 2005). Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 ist ebenfalls an Zelladhäsion, Migration und der Wundheilung beteiligt und es wurde in oxidativ gestresstem altem Gewebe differentiell exprimiert gefunden (Zou *et al.*, 2006). Das hier vorliegende Ergebnis der Abregulation von FN1 und VCAM-1 durch IRA unterstützt die Schlussfolgerung, dass es sich bei IRA um einen wichtigen Faktor in der Lichtalterung der Haut handelt.

Zusammengefasst unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, dass IRA-Strahlung an den lichtalterungsbedingten Veränderungen der extrazellulären Matrix beteiligt ist.

4.3 Die Rolle von Calcium in der IRA-Antwort

Es wurde bereits vermutet, dass IRA-Strahlung die zelluläre Calcium Homöostase und davon abhängige Signalprozesse beeinflusst. Lubart *et al.* (1997) haben demonstriert, dass die Verwendung eines Lasers im IRA-Bereich die Calcium Homöostase von Mitochondrien in Spermata verändert. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden

(Schroeder *et al.*, 2007), dass IRA zu einem erhöhten Level an mitochondrialem ROS führt, welcher bekannterweise als Auslöser von Calcium-Strömen und der Initiation von Calcium-abhängigem Signalfuss dient (Biswas *et al.*, 1999, 2005; Rosenstock *et al.*, 2004; Ichas *et al.*, 1997).

Die Expression der Na^+/K^+ -ATPase ATP1B1 ist nach IRA-Behandlung erniedrigt. ATP1B1 erhöht die Produktion von mitochondrialem ROS und reguliert den intrazellulären Calcium-Fluss (Xie & Cai, 2003) und ist somit ein Kandidat, der wahrscheinlich in den frühen Ereignissen der zellulären IRA-Antwort eine Rolle spielt. Im Zusammenhang mit Alterungsprozessen wird von einer Abnahme der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität berichtet, die durch oxidativen Stress hervorgerufen wird (Chakraborty *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde eine verringerte Expression der Na^+/K^+ -ATPase in gealterten Zellen vorgefunden (Dencher *et al.*, 2007).

Daher könnten IRA-induzierte Calciumsignal-Flüsse ebenfalls eine kompensatorische Abregulation der beteiligten Calciumkanäle hervorrufen. Beide IP_3 -Rezeptoren werden durch Bindung von Zytochrom C moduliert (Boehning *et al.*, 2003), welches vom Mitochondrium nach IRA-Bestrahlung freigesetzt wird (Frank *et al.*, 2004).

Darüber hinaus fand man die PI3Kinase in *C.elegans* welche MnSOD überexprimierten und *Drosophila daf-2*-Mutanten, welche über eine erhöhte Lebensspanne verfügen, diametral entgegengesetzt gegenüber dem Einfluss von IRA reguliert (Curtis *et al.*, 2007); es kommt in diesen beiden Modellorganismen der verzögerten Alterung zur Aufregulation von PI3K, währenddessen IRA zu einer Abregulation der Expression führt.

Zusammengenommen weisen die Daten aus den Microarrays und den PCR-Experimenten unterstützt durch Hinweise aus der Literatur deutlich darauf hin, dass Calcium- und Calcium-abhängige-Signaltransduktion in der zellulären IRA-Antwort eine Rolle spielt.

4.4 Beteiligung der Stress-Signalwege an der zellulären Reaktion auf IRA

Die verminderte Expression von IL6ST deutet auf eine Beteiligung des IL-6-Signalfusses in der IRA-Antwort hin. IL6ST spielt eine wichtige Rolle in der Neoangiogenese, da es die IL6-induzierte VEGF-Expression zusammen mit ERK1/2 vermittelt (Omori *et al.*, 2004). Der IL6-Weg könnte weitere Querverbindungen zu den IRA-induzierten Signalprozessen aufweisen, da der nicht-membran-assoziierte IL6-Rezeptor Calciumionen-Fluss induziert und selektiv die Chemokin-Expression in humanen dermalen Fibroblasten moduliert (Spörri *et al.*, 1999). Die Idee einer IL6-Beteiligung wird weiter unterstützt durch den Einfluss von IRA auf STAT3, ein wichtiges Ziel des IL6-Signalweges. Schädliche Effekte für die Haut wurden auch durch Aktivierung von STAT3 beschrieben (Aziz *et al.*, 2007) und STAT3 ist zudem auch ein Ziel der IRA-induzierbaren MAPKinase ERK1/2 (Chung *et al.*, 1997) sowie des retrograden mitochondrialen mTOR-Weges (Schieke & Finkel, 2006; Yokogami *et al.*, 2000), die weitere mögliche Querverbindungen zu IRA-Signalprozessen darstellen könnten.

4.5 Einfluss von IRA auf die Expression von Genen der Apoptose und zugehöriger Signalwege

Aufgrund der Komplexität der durch IRA-Strahlung regulierten Apoptose-assoziierten Gene, ist es schwer, auf einen eindeutig anti-apoptotischen IRA-Effekt auf Fibroblasten zu schließen. Die IRA-induzierte Abregulation von BAX kann als anti-apoptotischer Effekt betrachtet werden, aber auf der anderen Seite die Aufregulation von BAD als pro-apoptotisch. Interessanterweise reguliert die ROS-induzierte Modulation des Zellüberlebens über den PI3Kinase-/AKT-Pfad auf direktem Wege BAD (Clerkin *et al.*, 2008), was den Apoptose-modulierenden IRA-Effekt mit der erhöhten ROS-Menge nach Bestrahlung verbindet (Schroeder *et al.*, 2007). Die IRA-induzierte Regulation der vier in der *realtime*-PCR untersuchten Gene BAX, BAD, FASTK und TNFRSF6B deutet auf einen heterogenen Effekt von IRA auf die Apoptose hin. Dieser heterogene Effekt deckt sich mit den Ergebnissen von Frank *et al.* (2004), die durch IRA-gesteuerte, zunächst frühe apoptotische Ereignisse beobachteten, obwohl die Apoptose auf späteren Stufen blockiert ist. Die Microarray-Daten zeigen ebenfalls eine Abregulation von Caspasen (CASP-1, CASP-7) und darüber hinaus noch eine verminderte Expression eines weiteren pro-apoptotischen Gens FAF1 (Fas assoziierter Faktor 1), was daher die Idee, dass IRA Einfluss auf das Fortschreiten der Apoptose nehmen kann, unterstützt.

4.6 IRA-induzierte Signalwege

Die in den *realtime*-PCR-Experimenten analysierten Gene sind in ihrer Regulation durch IRA ebenfalls von der Mehrzahl der mit Hilfe der verschiedenen Inhibitoren untersuchten Signalwege beeinflusst und die Diversität der Beteiligungsmuster der verschiedenen Signalwege unterstreicht, dass es sich bei der zellulären IRA-Antwort um eine global auf die Fibroblastenzellen wirkende Reaktion handelt. Neben der bereits bekannten Rolle der MAP-Kinasen ERK1/2 für die Aufregulation von MMP-1 konnte hier gezeigt werden, dass dieser Signalweg eine Rolle in der IRA-abhängigen Regulation weiterer Gene spielt und es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der p38-, der JNK-, PI3K/AKT-, und der STAT3-Pfad ebenso wie Calcium-vermittelter Signalfluss stark an der IRA-Genantwort beteiligt sind.

4.7 Funktionelle Relevanz von ROS in der IRA-induzierten Genregulation

Mechanistisch betrachtet, zeigen die hier aufgeführten Daten, dass die Mitochondrien in Bezug auf die IRA-Antwort ein dominanter Faktor sind, aber der IRA-induzierte Signalfluss und die resultierenden Änderungen der Genexpression nicht alleine auf die Mitochondrien zurückzuführen sind. Es konnte vielmehr in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass IRA-Bestrahlung über den Effekt auf das mitochondrielle ROS hinaus zu zusätzlichem, ROS-abhängigem Signalfluss führt. Dieser zusätzliche durch ROS hervorgerufene Signalfluss ist unabhängig vom Mitochondrium und konnte somit nicht durch

Behandlung mit dem sich in den Mitochondrien anreichernden Antioxidanz MitoQ gestoppt werden. Eine Behandlung der Zellen mit NAC war hingegen in der Lage diesen IRA-induzierten Signalfuss zu verändern. Dies veranlasst zu der Vermutung, dass neben der mitochondrialen Elektronentransportkette (Krutmann & Schroeder, 2009; Karu, 2008) wenigstens ein weiteres IRA-Chromophor in einem anderen Kompartiment der Zelle existieren muss. Da aber das globale Auftreten von ROS in allen untersuchten Genen für die IRA-induzierte Genregulation nötig war, liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei den zusätzlichem IRA-Chromophor um weitere ROS-generierende Systeme der Zelle handeln könnte, wie z.B. die Familie der NADPH-Oxidasen. Diese Spekulation wird dadurch gestützt, dass die Mitglieder der NADPH-Oxidase Proteinfamilie wie auch die IRA-absorbierende mitochondrielle Cytochrom C Oxidase (Karu, 2008) in den Mitochondrien Kupferionen in ihrem katalytischen Zentrum besitzen (Morré *et al.*, 2008) und somit ein ähnlicher ROS-generierender Mechanismus denkbar wäre.

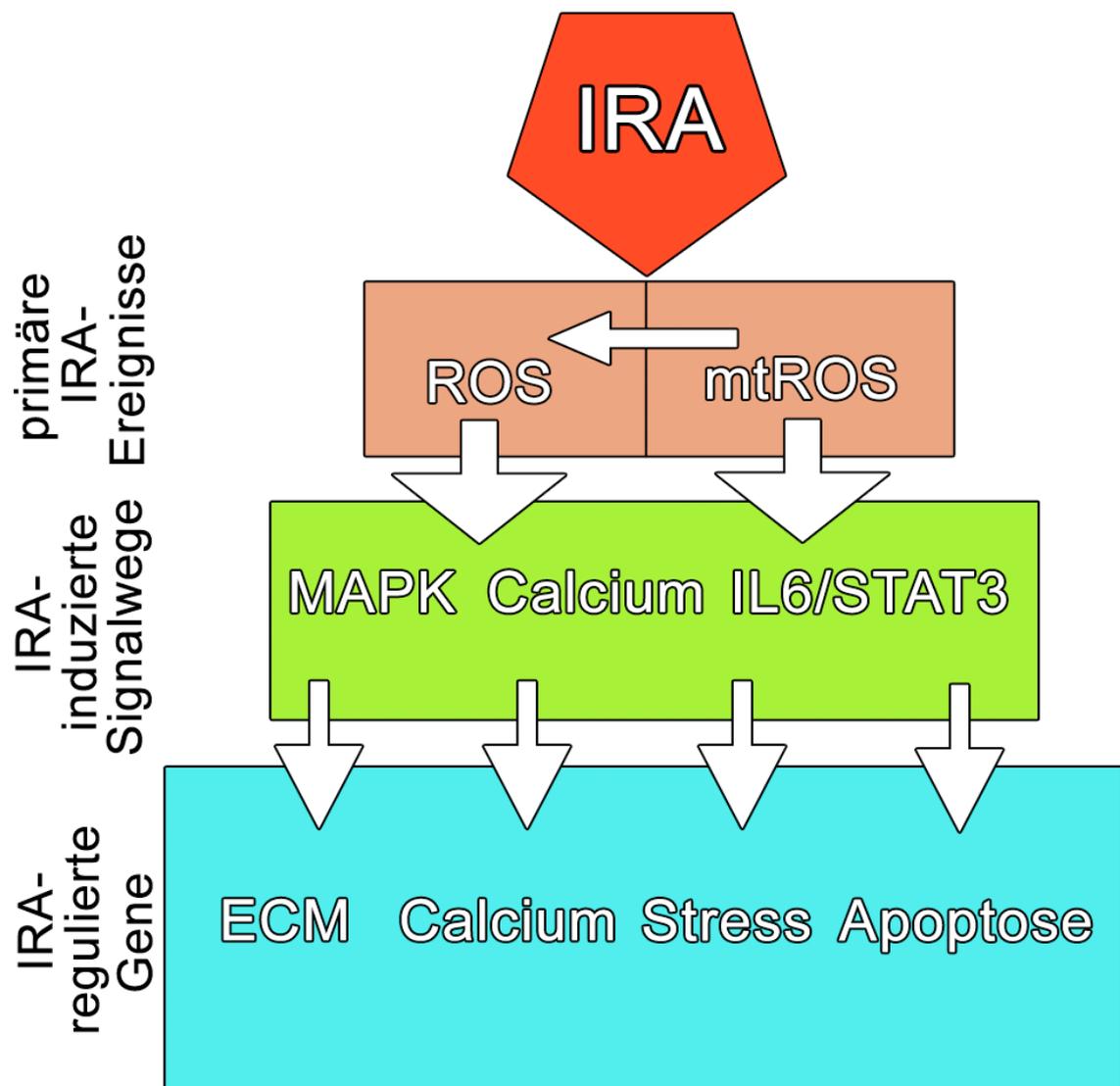


Abbildung 4.1: Schema der IRA-induzierten Genregulation.

4.8 Transkriptionsfaktoren in der IRA-Antwort

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Abgleich mit den Ergebnissen der Signalkinasen-Inhibitorexperimente und weiteren Befunden aus der Literatur eine Beteiligung der Transkriptionsfaktor-Kandidaten aus der *in silico*-Analyse in der IRA-Antwort sehr plausibel erscheinen lässt, so dass ein direkter Beweis der Beteiligung dieser Faktoren über DNS-Bindungsstudien und Reporter-gen-Assays in zukünftigen Experimenten sehr erfolgversprechend erscheint.

4.9 Übereinstimmungen zwischen IRA-regulierten Genen und beschriebenen IRA-Effekten

Verschiedene Effekte von IRA wurden bisher in der Literatur beschrieben, ein weiterer Einblick in die dahinter liegenden molekularen Mechanismen existierte jedoch nur in Teilen. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen ersten Einblick in einige dieser Phänomene und zudem zusätzliche Einsicht in bereits etablierte IRA-Effekte. Bezüglich des Lichtalterungseffekts von IRA in der Haut fokussierten sich bisherige Untersuchungen auf die Störung des dermalen Kollagengleichgewichts (Schroeder *et al.*, 2007, 2008b; Kim *et al.*, 2006; Buechner *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass IRA darüber hinaus die Expression von weiteren Genen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin 1, Integrine und anderer Proteine, welche den Zell-Matrix-Kontakt vermitteln, beeinflusst. Zur bereits beschriebenen Regulation der Angiogenese durch IRA (Kim *et al.*, 2006) lassen sich daran direkt funktionell beteiligte Gene wie VCAM-1 zuordnen, welche durch IRA reguliert sind, sowie weitere IRA-regulierte Gene, die sich für Aufrechterhalten und Organisation der ECM und Vermittlung des Zell-Matrix-Kontaktes verantwortlich zeigen (siehe oben), welche zudem auch für bei der Regulation der Angiogenese eine Rolle spielen.

Die therapeutische Anwendung von IRA beinhaltet den Einsatz zur Stimulation der kutanen Wundheilung (Danno *et al.*, 2001). Zusätzlich zur bekannten Beteiligung von MMP-9 konnten hier neue IRA regulierte Gene identifiziert werden, die bei der Zelladhäsion und der Zellmigration beteiligt sind und somit wahrscheinlich in der durch IRA-beschleunigten Wundheilung eine Rolle spielen. Die Behandlung von rheumatoider Arthritis profitiert vom anti-inflammatorischen Effekt von IRA (Shibata *et al.*, 2008). Die hier aufgeführten Daten zum IRA-Effekt des IL6/STAT3-Stressantwort-Weges und der Regulation von Chemokin-Liganden könnte einen mechanistischen Einblick in den IRA-gesteuerten, anti-inflammatorischen Effekt liefern. Im Hinblick auf die Wechselwirkung von IRA mit der UV-induzierten Apoptose (Menezes *et al.*, 1998; Jantschitsch *et al.*, 2008) konnte eine Aufregulation der anti-apoptotischen Gene FASTK und TNFRSF6B gezeigt werden und die Abregulation des proapoptotisch wirkenden BAX-Proteins bestätigt werden, neben der Regulation von weiteren Genen die an apoptotischen Prozessen oder am Zellzyklus und der Proliferationskontrolle beteiligt sind.

4.10 Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen IRA- und UV-bedingten Effekten

Bei Betrachtung der biologischen Endpunkte wie der Aufregulation von MMP-1 bei gleichzeitiger Erniedrigung der ColI α 1-Expression sind einige Ähnlichkeiten zwischen IRA und UV zu verzeichnen. Der mechanistische Einblick in die photochemischen und photobiologischen Prozesse der verschiedenen Strahlungsbereiche und die beteiligten Signalwege macht jedoch deutlich, dass sie substantiell voneinander verschieden sind (Krutmann & Schroeder, 2009). Dies wird dadurch unterstützt, dass sechs der in dieser Arbeit identifizierten IRA-regulierten Gene durch UV-Strahlung in genau entgegengesetzter Art reguliert wurden. Während nach IRA-Bestrahlung eine verminderte Expression von IL6ST, FN1 und BAX zu beobachten war, führt UVB hingegen zu einer verstärkten Expression dieser

Gene (Enk *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). IRA verursacht eine verstärkte BAD, STAT3 und TNFRSF6B Expression, UVB jedoch führt zu einer Abregulation der Expression dieser Gene (Enk *et al.*, 2006; Sano *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2001).

Auf der Ebene der Genexpression ist es somit nicht überraschend, dass ein Teil der IRA-regulierten Gene bereits ebenfalls durch UV Strahlung reguliert beschrieben worden sind. Diese Tatsache macht noch einmal deutlich, dass IRA eine wichtige Noxe ist, die gemeinsame Endpunkte mit UV besitzt, z.B. die Abregulation von FN1, ATP1A1 und TNFRSF6 (Lee *et al.*, 2005). Die Expression von VCAM-1 wird explizit als unbeeinflusst von UVA und UVB beschrieben (Heckmann *et al.*, 1994), IRA hingegen führte jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt, zu einer signifikant verminderten VCAM-1-Expression. Zusätzlich wurden hier sechs weitere IRA-regulierte Gene identifiziert (ATP1B1, FASTK, ITPR2, ITPR3, PIK3R3, PIP5K1B), für die keine veränderte Expression nach UV-Behandlung beschrieben wurde. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass IRA-Bestrahlung zu einer spezifischen zellulären Reaktion in den dermalen Fibroblasten führt, die sich trotz teilweise überlappender Endpunkte wie der Aufregulation von MMP-1 mechanistisch und funktionell von der Reaktion auf UV-Strahlung unterscheidet.

5 Zusammenfassung

Infrarot A-Strahlung (IRA, $\lambda = 760 - 1440 \text{ nm}$) ist ein maßgeblicher Bestandteil der Sonnenstrahlung und führt ähnlich wie ultraviolette (UV) Strahlung zur Lichtalterung in der menschlichen Haut durch erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) in humanen dermalen Fibroblasten. Dieser genregulatorische Effekt resultiert aus der IRA-induzierten Aktivierung des pleiotropischen MAPKinase ERK1/2 Signalweges, was zur in dieser Arbeit belegten Hypothese führte, dass die zelluläre Reaktion auf IRA-Exposition weit über die Aufregulation von MMP-1 hinaus reicht. In der hier vorliegenden Arbeit wurden daher die IRA-induzierten Veränderungen des Transkriptom in primären humanen dermalen Fibroblasten untersucht.

Microarray-Analysen zeigten 599 Transkripte durch physiologisch relevante Dosen an IRA in primären humanen Hautfibroblasten reguliert. Das IRA-induzierte Transkriptom unterscheidet sich deutlich von den Änderungen die durch UVB oder UVA im gleichen Zelltyp induziert werden. IRA-responsive Gene gehörten unter anderem zu folgenden vier Kategorien: Extrazelluläre Matrix, Calcium-Homöostase, Stress und Apoptose. Diese Ergebnisse wurden durch realtime-PCR-Analysen bestätigt, die die IRA-induzierte Regulation von 13 Genen aus den vier Kategorien in allen Fällen bestätigte. Unter Verwendung von chemischen Inhibitoren bekannter zellulärer Signaltransduktionswege konnte gezeigt werden, dass neben ERK1/2- auch die weiteren MAPKinasen p38 und JNK an der IRA-Antwort beteiligt sind, und dass darüberhinaus auch die PI3K/AKT-, STAT3-, IL-6- und Calcium-vermittelten Signalwege eine funktionelle Relevanz für die IRA-Genantwort besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass ein maßgeblicher Teil dieser Genregulation und der beteiligten Signalwege durch mitochondrielle und in geringerem Ausmaß auch durch nicht-mitochondrielle Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst wird, da bei der Zugabe von MitoQ, einem sich mitochondriell anreicherndem Antioxidanz, die Mehrzahl der untersuchten IRA-induzierten Genexpressionsveränderungen unterbunden werden konnten. Diese Arbeit charakterisiert IRA-Strahlung als einen potenten Regulator der Genexpression in menschlichen Hautzellen.

Bei der zellulären IRA-Antwort in Fibroblasten handelt es sich um eine spezifische Reaktion, die sich trotz teilweise überlappender biologischer Endpunkte deutlich von der Reaktion auf andere Noxen des elektromagnetischen Spektrums unterscheidet. Die hier erstmals identifizierten IRA-regulierten Gene sind von entscheidender Wichtigkeit für die Homöostase der menschlichen Haut. Die in dieser Arbeit gewonnenen Expressionsdaten bestätigen und vertiefen die Erkenntnis, dass die von IRA induzierten Veränderungen der Genexpression zur vorzeitigen Hautalterung beitragen und die Aufklärung der Vielzahl an der IRA-Antwort beteiligten Gene und Signalwege weist daraufhin, dass weitere durch IRA-ausgelöste biologische Effekte in der menschlichen Haut zu erwarten sind.

6 Summary

Infrared A radiation (IRA, $\lambda = 760 - 1440$ nm) is a major part of natural sunlight. Similar to ultraviolet (UV) radiation, IRA leads to light induced ageing of human skin, mainly caused by increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) in human dermal fibroblasts. As increased expression of MMP-1 resulted from IRA induced activation of pleiotropic MAPkinase ERK1/2 signaling pathway, this led to the hypothesis proved in this thesis that the cellular reaction to IRA exposition reaches far beyond the upregulation of MMP-1. Therefore this study focused on the IRA induced changes of the transcriptome of human primary dermal fibroblasts.

Microarray-analysis showed 599 transcripts being regulated by physiological relevant doses of IRA in primary human dermal fibroblasts. The IRA induced transcriptome clearly differs from the changes induced by UVB or UVA in the same cell type. IRA responsive genes, among others, fell into these four categories: extracellular matrix, calcium homeostasis, stress and apoptosis. These results were verified by realtime-PCR analysis, confirming the IRA induced regulation of thirteen genes from all four categories in all cases. With the use of chemical inhibitors of known cellular signal transduction pathways it could be shown that besides ERK 1/2 the other MAPkinases p38 and JNK were involved in the IRA response as well. Furthermore it could be shown that PI3K/AKT-, STAT3-, IL6- and calcium mediated signaling has a functional relevance for the IRA gene response. Additionally, the results of this work point out that a major part of this gene regulation and involved signaling is dependent on the production of reactive oxygen species (ROS) in the mitochondria and to a lesser extent to non-mitochondrial ROS production, as application of MitoQ, a mitochondrium targeted antioxidant could abrogate most of the IRA induced gene expression modulation. This work characterizes IRA radiation as a potent regulator of gene expression in human skin cells.

The cellular IRA response in fibroblasts is a specific reaction, which besides partially overlapping endpoints clearly differs from the reaction to other noxae from the electromagnetic spectra. The IRA regulated genes identified for the first time within this work are of crucial importance for skin homeostasis. The gene expression data gained by this work confirms and deepens the insight that IRA induced gene expression changes account for premature skin ageing. Elucidation of the multitude genes and signaling pathways involved in the IRA response points towards further IRA triggered biological effects that can be expected to occur in human skin.

7 Literatur

- Afroze, T, Sadi, AM, Momen, MA, Gu, S, Heximer, S & Husain, M (2007). c-Myb-dependent inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(6), 1305–1311.
- Amat, A, Rigau, J, Waynant, RW, Ilev, IK & Anders, JJ (2004). The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. *J Photochem Photobiol B:Biophys*, 82, 152–160.
- Applegate, LA, Scaletta, C, Panizzon, R, Frenk, E, Hohlfeld, P & Schwarzkopf, S (2000). Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation: implications in skin repair. *Int J Mol Med*, 5, 247–251.
- Aziz, MH, Manoharan, HT & Verma, AK (2007). Protein kinase C epsilon, which sensitizes skin to sun's UV radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas, associates with Stat3. *Cancer Res*, 67(3), 1385–1394.
- Beidelschies, MA, Huang, H, McMullen, MR, Smith, MV, Islam, AS, Goldberg, VM, Chen, X, Nagy, LE & Greenfield, EM (2008). Stimulation of macrophage TNFalpha production by orthopaedic wear particles requires activation of the ERK1/2/Egr-1 and NF-kappaB pathways but is independent of p38 and JNK. *J Cell Physiol*, 217(3), 652–666.
- Bek, MJ, Reinhardt, HC, Fischer, KG, Hirsch, JR, Hupfer, C, Dayal, E & Pavenstädt, H (2003). Up-regulation of early growth response gene-1 via the CXCR3 receptor induces reactive oxygen species and inhibits Na⁺/K⁺-ATPase activity in an immortalized human proximal tubule cell line. *J Immunol*, 170(2), 931–940.
- Böing, I, Stross, C, Radtke, S, Lippok, BE, Heinrich, PC & Hermanns, HM (2006). Oncostatin M-induced activation of stress-activated MAP kinases depends on tyrosine 861 in the OSM receptor and requires Jak1 but not Src kinases. *Cell Signal*, 18(1), 50–61.
- Biswas, G, Adebajo, OA, Freedman, BD, Anandatheerthavarada, HK, Vijayasarathy, C, Zaidi, M, Kotlikoff, M & Avadhani, NG (1999). Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J*, 18(3), 522–533.
- Biswas, G, Guha, M & Avadhani, NG (2005). Mitochondria-to-nucleus stress signaling in mammalian cells: nature of nuclear gene targets, transcription regulation, and induced resistance to apoptosis. *Gene*, 354, 132–139.
- Biswas, SK & Sodhi, A (2002). Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol*, 2(8), 1095–1107.
- Boehning, D, Patterson, RL, Sedaghat, L, Glebova, NO, Kurosaki, T & Snyder, SH (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, 5(12), 1051–1061.
- Boerma, M, Burton, GR, Wang, J, Fink, LM, Jr, RE McGehee & Hauer-Jensen, M (2006). Comparative expression profiling in primary and immortalized endothelial cells: changes in gene expression in response to hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 17(3), 173–180.

- Bolstadt, BM, Irizarry, RA, Åstrand, M & Speed, TF (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19(2), 185–193.
- Brenneisen, P., Sies, H. & Scharffetter-Kochanek, K. (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 973, 31–43.
- Buechner, N, Schroeder, P, Jakob, S, Kunze, K, Maresch, T, Calles, C, Krutmann, J & Haendeler (2008). Changes of MMP-1 and collagen type Ialpha1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp Gerontol*, 43(7), 633–637.
- Butow, RA & Avadhani, NG (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell*, 14, 1–15.
- Camello-Almaraz, C, Gomez-Pinilla, PJ, Pozo, M & Camello, PJ (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1082–C1088.
- Campbell & Reece (2003). *Anatomie*, Band 8. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Campbell & Reece (2005). *Biology*, Band Seventh edition. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc.
- Chakraborty, H, Sen, P, Sur, A, Chatterjee, U & Chakrabarti, S (2003). Age-related oxidative inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp Gerontol*, 38(6), 705–710.
- Chen, W, Kang, J, Xia, J, Li, Y, Yang, B, Chen, B, Sun, W, Song, X, Xiang, W, Wang, X, Wang, F, Wan, Y & Bi, Z (2008). p53-related apoptosis resistance and tumor suppression activity in UVB-induced premature senescent human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.*, 21(5), 645–653.
- Chiarugi, P (2005). PTPs versus PTKs: the redox side of the coin. *Free Radic Res.*, 39(4), 353–364.
- Chung, J, Uchida, E, Grammer, TC & Blenis, J (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 17(11), 6508–6516.
- Cicchillitti, L, Jimenez, SA, Sala, A & Saitta, B (2004). B-Myb acts as a repressor of human COL1A1 collagen gene expression by interacting with Sp1 and CBF factors in scleroderma fibroblasts. *Biochem J*, 378(2), 609–616.
- Clerkin, JS, Naughton, R, Quiney, C & Cotter, TG (2008). Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett*, 266(1), 30–36.
- Corre, S, Primot, A, Sviderskaya, E, Bennett, DC, Vaulont, S, Goding, CR & Galibert, MD (2004). UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem*, 279(49), 51226–51233.
- Curtis, C, Landis, GN, Folk, D, Wehr, NB, Hoe, N, Waskar, M, Abdueva, D, Skvortsov, D, Ford, D, Luu, A, Badrinath, A, Levine, RL, Bradley, TJ, Tavaré, S & Tower, J (2007). Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes. *Genome Biol*, 8(12), R262.
- Dalma-Weiszhausz, DD, Warrington, J, Tanimoto, EY & Miyada, CG (2006). The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol*, 410, 3–28.
- Danno, K, Mori, N, Toda, K, T, T Kobayashi & Utani, A (2001). Near infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: Laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 17, 261–265.

7 Literatur

- Danno, K & Sugie, N (1996). Effects of near-infrared radiation on the epidermal proliferation and cutaneous immune function in mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 12(6), 233–236.
- de Guise, C, Lacerte, A, Rafiei, S, Reynaud, R, Roy, M, Brue, T & Lebrun, JJ (2006). Activin inhibits the human Pit-1 gene promoter through the p38 kinase pathway in a Smad-independent manner. *Endocrinology*, 147(9), 4351–4362.
- Dencher, NA, Frenzel, M, Reifschneider, NH, Sugawa, M & Krause, F (2007). Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1100, 291–298.
- Dubart, A, Roméo, PH, Vainchenker, W & Dumenil, D (1996). Constitutive expression of GATA-1 interferes with the cell-cycle regulation. *Blood*, 87(9), 3711–3721.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Brown, K., Kelly, K. & Siebenlist, U. (1997). Direct activation of the stress-activated protein kinase (SAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathways by an inducible mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase 3 (MEKK) derivative. *J. Biol. Chem.*, 272(5), 2668–2674.
- Elstner, E (1990). *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich.
- Endres, L & Fritsch, P (1997). *Physikalische Grundlagen, Lichtquellen, Dosimetrie*. In: *Krutmann, J., Hönigsmann, H.(Hrsg.): Handbuch der dermatologischen Phototherapie und Photodiagnostik.*, Band 2. Auflage. Springer, Berlin.
- Enk, CD, Jacob-Hirsch, J, Gal, H, Verbovetski, I, Amariglio, N, Mevorach, D, Ingber, A, Givol, D, Rechavi, G & Hochberg, M (2006). The UVB-induced gene expression profile of human epidermis in vivo is different from that of cultured keratinocytes. *Oncogene*, 25, 2601–2614.
- Ezoe, S, Matsumura, I, Gale, K, Satoh, Y, Ishikawa, J, Mizuki, M, Takahashi, S, Minegishi, N, Nakajima, K, Yamamoto, M, Enver, T & Kanakura, Y (2005). GATA transcription factors inhibit cytokine-dependent growth and survival of a hematopoietic cell line through the inhibition of STAT3 activity. *J Biol Chem*, 280(13), 13163–13170.
- Fisher, GJ, Kang, S, Varani, J, Bata-Csorgo, Z, Wan, Y, Datta, S & Voorhees, JJ (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*, 138(11), 1462–1470.
- Fisher, GJ, Wang, ZQ, Datta, SC, Varani, J, Kang, S & Voorhees, JJ (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med*, 337(20), 1419–1428.
- Frank, S, Menezes, S, Coster, C Lebreton-De, Oster, M, Dubertret, L & Coulomb, B (2006). Infrared radiation induces the p53 signalling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity. *Exp. Dermatol*, 15, 130–137.
- Frank, S, Oliver, L, Coster, C Lebreton-De, Moreau, C, Lecabellec, M-T, Laurence, M, Vallette, FM, Dubertret, L & Coulomb, B (2004). Infrared Radiation Affects the Mitochondrial Pathway of Apoptosis in Human Fibroblasts. *J Invest Dermatol*, S. 823–831.
- Freedberg, I., Eisen, A., Wolff, K., Austen, K., Goldsmith, L. & Katz, S. (2003). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, Band 6th edition. Mc Graw - Hill, New York.
- Fritsch, P. (2004). *Dermatologie und Venerologie - Lehrbuch und Atlas*, Band 2. Auflage. Springer, Berlin.
- Gautier, Laurent, Cope, Leslie, Bolstad, Benjamin M. & Irizarry, Rafael A. (2004). Affy: analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*, 20(3), 307–315.
- Gene, Ontology Consortium (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research, Database Issue*, 32, D258–D261.
- Gilchrest, B.A. & Krutmann, J. (2006). *Photoaging*. Springer, Heidelberg - New York.

- Girolamo, N. Di, Coroneo, M. & Wakefield, D. (2005). Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after UVB radiation. *Am. J. Pathol.*, 167(2), 489–503.
- Grether-Beck, S., Buettner, R. & Krutmann, J. (1997). Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: molecular and photobiological mechanisms. *Biol. Chem.*, 378(11), 1231–1236.
- Heckmann, M, Eberlein-König, B, Wollenberg, A, Przybilla, B & Plewig, G (1994). Ultraviolet-A radiation induces adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Br J Dermatol*, 131(3), 311–318.
- Hijova, E. (2005). Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl. Lek. Listy*, 106(3), 127–132.
- Holzenberger, M, Kappeler, L & Filho, C De Magalhaes (2004). IGF-1 signaling and aging. *Exp Gerontol*, 39(11-12), 1761–1764.
- Horwitz, LR, Burke, TJ & Carnegie, D (1999). Augmentation of wound healing using monochromatic infrared energy. Exploration of a new technology for wound management. *Adv Wound Care*, 12, 35–40.
- Ichas, F, Jouaville, LS & Mazat, JP (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, 89, 1145–1153.
- Jantschitsch, C, Majewski, S, Maeda, A, Schwarz, T & Schwarz, A (2008). Infrared Radiation Confers Resistance to UV-Induced Apoptosis Via Reduction of DNA Damage and Upregulation of Antiapoptotic Proteins. *J Invest Dermatol*, S. [Epub ahead of print].
- Karu, TI (2008). Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol*, 84(5), 1091–1099.
- Karu, TI, Pyatibrat, LV & Afanasyeva, NI (2004). A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol*, 80(2), 366–372.
- Karu, TI, Pyatibrat, LV & Kalendo, GS (2001). Cell attachment modulation by radiation from a pulsed light diode ($\lambda = 820$ nm) and various chemicals. *Lasers Surg Med*, 28(3), 227–236.
- Kim, HH, Lee, MJ, Lee, SR, Kim, KH, Cho, KH, Eun, HC & Chung, JH (2005). Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev*, 126(11), 1170–1177.
- Kim, MS, Kim, YK, Cho, KH & Chung, JH (2006). Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech Ageing Dev*, 127(12), 875–882.
- Kligman, LH (1982). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Arch Dermatol Res*, 272(3-4), 229–238.
- Kochevar, IE, Taylor, CR & Krutmann, J (2008). *Fundamentals of cutaneous photobiology and photoimmunology*. In: Wolff, K., Goldsmith, L.A., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A.S., Lefell, D.J. (Eds.), *Fitpatrick's Dermatology in General Medicine*, Band 7. Auflage. McGraw-Hill, New York.
- Kok, SH, Hong, CY, Kuo, MY, Wang, CC, Hou, KL, Lin, YT, Galson, DL & Lin, SK (2009). Oncostatin M-induced CCL2 transcription in osteoblastic cells is mediated by multiple levels of STAT-1 and STAT-3 signaling: An implication for the pathogenesis of arthritis. *Arthritis Rheum*, 60(5), 1451–1462.
- Kopecki, Z, Luchetti, MM, Adams, DH, Strudwick, X, Mantamadiotis, T, Stoppacciaro, A, Gabrielli, A, Ramsay, RG & Cowin, AJ (2007). Collagen loss and impaired wound healing is associated with c-Myb deficiency. *J Pathol*, 211(3), 351–361.

- Krutmann, J & Gilchrest, BA (2006). *Photoaging of skin*. In: Gilchrest, B., Krutmann, J. (Eds.), *Skin Aging*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Krutmann, J & Schroeder, P (2009). . *JIDSP*.
- Kuo, TH, Liu, BF, Yu, Y, Wuytack, F, Raeymaekers, L & Tsang, W (1997). Co-ordinated regulation of the plasma membrane calcium pump and the sarco(endo)plasmic reticular calcium pump gene expression by Ca²⁺. *Cell Calcium*, 21(6), 399–408.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lamb, FS, Clayton, GH, Liu, BX, Smith, RL, Barna, TJ & Schutte, BC (1999). Expression of CLCN voltage-gated chloride channel genes in human blood vessels. *J Mol Cell Cardiol*, 31(3), 657–66.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. & Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev. Oncol. Hematol.*, 49(3), 187–198.
- LaPensee, CR, Hugo, ER & Ben-Jonathan, N (2008). Insulin stimulates interleukin-6 expression and release in LS14 human adipocytes through multiple signaling pathways. *Endocrinology*, 149(11), 5415–5422.
- Lee, K.M., Lee, J.G., Seo, E.Y., Lee, W.H., Nam, Y.H., Yang, J.M., Kee, S.H., Seo, Y.J., Park, J.K., Kim, C.D. & Lee, J.H. (2005). Analysis of genes responding to ultraviolet B irradiation of HaCaT keratinocytes using a cDNA microarray. *British Journal of Dermatology*, 152, 52–59.
- Leiss, M, Beckmann, K, Girós, A, Costell, M & Fässler, R (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol*, 20(5), 502–507.
- Lemaitre, V. & D'Armiento, J. (2006). Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today*, 78(1), 1–10.
- Leu, JI, Crissey, MA, Leu, JP, Ciliberto, G & Taub, R (2001). Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol Cell Biol*, 21(2), 414–424.
- Li, W, Kedersha, N, Chen, S, Gilks, N, Lee, G & Anderson, P (2004). FAST is a BCL-X(L)-associated mitochondrial protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 318(1), 95–102.
- Liochev, SI & Fridovich, I (2007). The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med*, 42(10), 1465–1469.
- Lubart, R, Friedmann, H, Sinyakov, M, Cohen, N & Breitbart, H (1997). Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers Surg. Med*, 21(5), 493–499.
- Maeda, T, Hao, C & Tron, VA (2001). Ultraviolet light (UV) regulation of the TNF family decoy receptors DcR2 and DcR3 in human keratinocytes. *Cutan Med Surg.*, 5(4), 294–298.
- Maere, Steven, Heymans, Karel & Kuiper, Martin (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*, 21(16), 3448–3449.
- Mahns, A., Melchheier, I., Suschek, C. V., Sies, H. & Klotz, L. O. (2003). Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.*, 37(4), 391–397.
- medOCT group (2006). Der Aufbau der Haut - medOCT-group at the Centre of biomedical Technology and Physics, Medical University Vienna, siehe: <http://www.medoct.at/>

- Menezes, S, Coulomb, B, Lebreton, C & Dubertret, L (1998). Non-coherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblasts from solar ultraviolet toxicity. *J Invest Dermatol*, 111(4), 629–633.
- Molinari, J, Ruszova, E, Velebny, V & Robert, L (2008). Effect of advanced glycation endproducts on gene expression profiles of human dermal fibroblasts. *Biogerontology*, 9(3), 177–182.
- Morré, DJ, Jiang, Z, Marjanovic, M, Orczyk, J & Morré, DM (2008). Response of the regulatory oscillatory behavior of copperII-containing ECTO-NOX proteins and of CuIICl₂ in solution to electromagnetic fields. *J Inorg Biochem.*, 102(9), 1812–1818.
- Nagata, M, Arimitsu, N, Ito, T & Sekimizu, K (2007). Antioxidant N-acetyl-L-cysteine inhibits erythropoietin-induced differentiation of erythroid progenitors derived from mouse fetal liver. *Cell Biol Int*, 31(3), 252–256.
- Neel, B. G. & Tonks, N. K. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9(2), 193–204.
- Nowak, M, Helleboid-Chapman, A, Jakel, H, Martin, G, Duran-Sandoval, D, Staels, B, Rubin, EM, Pennacchio, LA, Taskinen, MR, Fruchart-Najib, J & Fruchart, JC (2005). Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. *Mol Cell Biol*, 25(4), 1537–1548.
- Oakes, SA, Scorrano, L, Opferman, JT, Bassik, MC, Nishino, M, Pozzan, T & Korsmeyer, SJ (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci*, 102(1).
- Omori, K, Naruishi, K, Nishimura, F, Yamada-Naruishi, N & Takashiba, S (2004). High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J Biol Chem*, 279(8), 6643–6649.
- Pani, E & Ferrari, S (2008). p38MAPK delta controls c-Myb degradation in response to stress. *Blood Cells Mol Dis*, 40(3), 288–394.
- Pankow, S, Bamberger, C, Klippel, A & Werner, S (2006). Regulation of epidermal homeostasis and repair by phosphoinositide 3-kinase. *J Cell Sci*, 119(19), 4033–4046.
- Püschel, HU, Chang, J, Müller, PK & Brinckmann, J (1995). Attachment of intrinsically and extrinsically aged fibroblasts on collagen and fibronectin. *J Photochem Photobiol B*, 27(1), 39–46.
- Quentien, MH, Barlier, A, Franc, JL, Pellegrini, I, Brue, T & Enjalbert, A (2006). Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *Neuroendocrinol*, 18(9), 633–642.
- Reimann, V, Krämer, U, Sugiri, D, Schroeder, P, Hoffmann, B, Medve-Koenigs, K, Jöckel, KH, Ranft, U & Krutmann, J (2008). Sunbed use induces the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Invest Dermatol*, 128(5), 1294–1297.
- Roose, J & Clevers, H (1999). TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1424(2-3), M23–37.
- Rosenstock, TR, Carvalho, AC, Jurkiewicz, A, Frussa-Filho, R & Smaili, SS (2004). Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem*, 88(5), 1220–1228.
- Sakamoto, T, Ishibashi, T & Maruyama, Y (2007). Role of Ca(2+)influx in tissue factor expression in monocyte adhesion to endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*, 14(3), 109–115.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.*, Band second edition. Cold Spring harbor Laboratory, New York.

- Sano, S, Chan, KS, Kira, M, Kataoka, K, Takagi, S, Tarutani, M, Itami, S, Kiguchi, K, Yokoi, M, Sugasawa, K, Mori, T, Hanaoka, F, Takeda, J & DiGiovanni, J (2005). Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation. *Cancer Res.*, 65(13), 5720–5729.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Briviba, K. & Sies, H. (1993). Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, 331(3), 304–306.
- Schauen, M, Hornig-Do, HT, Schomberg, S, Herrmann, G & Wiesner, RJ (2007). Mitochondrial electron transport chain activity is not involved in ultraviolet A (UVA)-induced cell death. *Free Radic Biol Med*, 42, 499–509.
- Schieke, SM & Finkel, T (2006). Mitochondrial signaling, TOR, and life span. *Biol Chem*, 387(10-11), 1357–1361.
- Schieke, SM, Schroeder, P & Krutmann, J (2003). Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19, 228–234.
- Schieke, SM, Stege, H, Kürten, V, Grether-Beck, S, Sies, H & Krutmann, J (2002). Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 119, 1323–1329.
- Schroeder, P, Haendeler, J & Krutmann, J (2008). The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Exp Gerontol*, 43(7), 629–632.
- Schroeder, P, Lademann, J, Darvin, ME, Stege, H, Marks, C, Bruhnke, S & Krutmann, J (2008). Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. *J Invest Dermatol*, 128(10), 2491–2497.
- Schroeder, P, Pohl, C, Calles, C, Marks, C, Wild, S & Krutmann, J (2007). Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med*, 43(1), 138–135.
- Seger, R. & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9(9), 726–735.
- Shannon, Paul, Markiel, Andrew, Ozier, Owen, Baliga, Nitin S., Wang, Jonathan T., Ramage, Daniel, Amin, Nada, Schwikowski, Benno & Ideker, Trey (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13, 2498–2504.
- Shibata, Y, Araki, H, Oshitani, T, Imaoka, A, Matsui, M, Miyazawa, K & Abiko, Y (2008). Effects of linear polarized infrared light irradiation on the transcriptional regulation of IL-8 expression in IL-1beta-stimulated human rheumatoid synoviocytes involves phosphorylation of the NF-kappaB RelA subunit. *J Photochem Photobiol B*, S. [Epub ahead of print].
- Shin, MH, Moon, YJ, Seo, JE, Lee, Y, Kim, KH & Chung, JH (2008). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radic Biol Med*, 44, 635–645.
- Spörri, B, Müller, KM, Wiesmann, U & Bickel, M (1999). Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. *Int Immunol*, 11(7), 1053–1058.
- Sun, H, Palaniswamy, S, Pohar, T, Jin, V & Davuluri, RV (2006). MPromDb: An integrated resource for annotation and visualization of mammalian gene promoters and ChIP-chip experimental data. *Nucleic Acids Research, Database Issue*, 34, D98–D103.
- Tang, Q, Chen, W, Gonzales, MS, Finch, J, Inoue, H & Bowden, GT (2001). Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Oncogene*, 20(37), 5164–5172.

- Tauskela, JS (2007). MitoQ—a mitochondria-targeted antioxidant. *IDrugs*, 10(6), 399–412.
- Trifunovic, A, Wredenberg, A, Falkenberg, M, Spelbrink, JN, Rovio, AT, Bruder, CE, Bohlooly, YM, Gidlöf, S, Oldfors, A, Wibom, R, Törnell, J, Jacobs, HT & Larsson, NG (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 27(429), 417–423.
- Valdés, JA, Hidalgo, J, Galaz, JL, Puentes, N, Silva, M, Jaimovich, E & Carrasco, MA (2007). NF-kappaB activation by depolarization of skeletal muscle cells depends on ryanodine and IP3 receptor-mediated calcium signals. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(5), C1960–1970.
- Weernink, PA Oude, Schmidt, M & Jakobs, KH (2004). Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *Eur J Pharmacol*, 500(1-3), 87–99.
- Wenk, J, Schüller, J, Hinrichs, C, Syrovets, T, Azoitei, N, Podda, M, Wlaschek, M, Brenneisen, P, Schneider, LA, Sabiwalsky, A, Peters, T, Sulyok, S, Dissemond, J, Schauen, M, Krieg, T, Wirth, T, Simmet, T & Scharffetter-Kochanek, K (2004). Overexpression of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in human dermal fibroblasts abrogates UVA irradiation-induced expression of interstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1 by suppression of phosphatidylcholine hydroperoxide-mediated NFkappaB activation and interleukin-6 release. *J Biol Chem.*, 279(44), 45634–45642.
- Wlaschek, M., Heinen, G., Poswig, A., Schwarz, A., Krieg, T. & Scharffetter-Kochanek, K. (1994). UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem. Photobiol.*, 59(5), 550–556.
- Woessner, JF & Nagase, H (2000). *Matrix metalloproteinases and TIMPs*, Band Seventh edition. Oxford University Press, New York.
- Wolfson, M, Budovsky, A, Tacutu, R & Fraifeld, V (2009). The signaling hubs at the crossroad of longevity and age-related disease networks. *Int J Biochem Cell Biol.*, 41(3), 516–520.
- Xie, Z & Cai, T (2003). Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.*, 3(3), 157–168.
- Yaar, M (2006). *Clinical and histological features of intrinsic versus extrinsic skin aging*. In: Gilchrist, B., Krutmann, J. (Eds.), *Skin Aging*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Yang, CR, Hsieh, SL, Ho, FM & Lin, WW (2005). Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. *J Immunol*, 174(3), 1647–1656.
- Yokogami, K, Wakisaka, S, Avruch, J & Reeves, SA (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*, 10(1), 47–50.
- Zambrzycka, A (2004). Aging decreases phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level but has no effect on activities of phosphoinositide kinases. *Pol J Pharmacol*, 56(5), 651–654.
- Zastrow, L, Groth, N, Klein, F, Kockott, D, Lademann, J, Renneberg, R & Ferrero, L (2009). The missing link—light-induced (280-1600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol Physiol.*, 22(1), 31–44.
- Zou, Y, Yoon, S, Jung, KJ, Kim, CH, Son, TG, Kim, MS, Kim, YJ, Lee, J, Yu, BP & Chung, HY (2006). Upregulation of aortic adhesion molecules during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(3), 232–244.

8 Abkürzungen

AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATP2B4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAX	BCL2-associated X Protein
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD10	Caspase recruitment domain family, member 10
CASP-1	Caspase 1
CASP-7	Caspase 7
CDH10	Cadherin 10, Typ 2
cDNS	copy-Desoxyribonukleinsäure
CEACAM-1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CCL2	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2
CICN3	Chloride Channel 3
CNN1	Calponin 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Coll α 1	Kollagen, Typ I, alpha 1
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREBATF	CREB/ATF Bindestelle
CREBP1	CREB binding protein
CSN2	Kasein beta
CT	Amplifizierungszyklen pro Zeit
CX4CL1	Chemokin (C-X-4 Motiv) Ligand 1
CXCL6	Chemokin (C-X-4CMotiv) Ligand 6
CXCL9	Chemokin (C-X-4CMotiv) Ligand 9
daf-2	abnormal DAuer Formation 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGR	Early Growth Response
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinases 1 + 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FASTK	Fas-aktivierte Serin/Threonin kinase

FCS	Fetal Calf Serum
FN1	Fibronektin 1
Fos	Proto-oncogene Protein c-fos
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA	GATA-binding Protein
GGT1	Gamma-Glutamyltransferase 1
GO	Gene Ontology
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondimer (mit Disulfidbrücke)
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' balanced Salt Solution
HELIOS	IKAROS family zinc finger 2(Helios)
HRP	Horseradish Peroxidase
IKbetaKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase ga
IL6ST	Interleukin 6 Signal Transducer
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IR	Infrarot, bzw. infrarote Strahlung
IRA	Infrarot A
IRB	Infrarot B
IRC	Infrarot C
ITGA10	Integrin, alpha 10
ITGB5	Integrin beta 5
ITPR2	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor, Typ 3
ITPR3	Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor, Typ 3
JNK1/2	c-Jun NH2-terminale Kinasen 1 + 2
Jun	C-Jun-amino-terminal Kinase-interacting Protein
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEKK	Mitogen-Activated protein Kinase Kinase
MEM	Minimal Essential Medium
MitoQ	sich gezielt in den Mitochondrien anreicherndes Coenzym Q10
MMP	Matrixmetalloproteinase
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Myb	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
NAC	N-Acetyl-Cystein
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase
NF-κB	Nuclear factor-κ B
NFE2	Nnuclear factor (erythroid-derived 2)
NFMUE	Nukleärer Transkriptionsfaktor mue
NRF1	Nuclear respiratory factor 1

P4	Transkriptionsfaktor P4
p38	Mitogen-Activated Protein Kinase p38
p53	Tumor Protein 53
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIK3R3	Phosphoinositid-3-kinase, regulatorische Subunit 3
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP5K1B	Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase, Typ I, beta
POU1	POU-Domäne bindender Transkriptionsfaktor 1
PP2A	Proteinphosphatase-2A
PTDRD	Proteintyrosinphosphatase Rezeptor
PTDSR	Phosphatidylserinrezeptor
PTF	predicted transcription factor binding site
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Raf	Raf Kinase
Ras	GTPase NRas
RMA	robust multichip average
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SDS	Sodiumdodekylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SP1	Sp1 Transkriptionsfaktor
TACR1	Tachykinin Rezeptor 1
TATA	Tata-Transkriptionsfaktorbindestelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCF	Hepatocyte nuclear factor 4, alpha (auch HNF4A)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGFbeta	Transforming Growth Factor, beta 1
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TM	Schmelztemperatur (Temperature of melting)
TNFRSF6B	Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor Superfamilie, Mitglied 6b, Köder
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP2	Thrombospondin 2
TXNDC4	Endoplasmatisches Retikulum-Protein 44
USF	Upstream Transkriptionsfaktor
UV	ultraviolett, bzw. Ultraviolette Strahlung
UVA	ultraviolett A, bzw. ultraviolette Strahlung A (320 - 400 nm)
UVB	ultraviolett B, bzw. ultraviolette Strahlung B (280 - 320 nm)
VIS	sichtbares Licht
VCAM-1	Vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül 1

ZIC2

Zic family member 2

9 Anhang

Die Roh-Daten und die normalisierten Genexpressions-Werte für alle in dieser Arbeit beschriebenen Microarray-Experimente wurden in der *NCBI Gene Expression Omnibus*-Datenbank hinterlegt und sind zugänglich über die *GEO-Series* Zugangs-Nummer GSE17046 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17046>). Diese Expressionsdaten sind ausserdem auch auf dem zu dieser Arbeit gehörenden Datenträger enthalten.

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Tabelle 9.1: Vollständige Liste der IRA-regulierten Transkripte. Aufregulierte Transkripte nach IRA (A), bei x von 9 Fällen aufreguliert. Abregulierte Transkripte (B), in x von 9 Experimenten abreguliert.

A					
Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
209215_at	Hs.157145	5	tetracycline transporter-like protein	TETTRAN	small molecule transport
220052_s.at	Hs.7797	5	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2	TINF2	telomerase-dependent telomere maintenance
204699_s.at	Hs.194754	5	hypothetical protein MGC29875	MGC29875	
222079_at	Hs.98416	5	Homo sapiens transcribed sequences	—	
204282_s.at	Hs.57969	4	phenylalanine-tRNA synthetase 1 (mitochondrial)	FARS1	phenylalanyl-tRNA aminoacylation
208992_s.at	Hs.421342	4	signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	acute-phase response
209434_s.at	Hs.311625	4	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	PPAT	purine base biosynthesis
210785_s.at	Hs.10649	4	chromosome 1 open reading frame 38	C1orf38	cell adhesion
213659_at	Hs.355015	4	zinc finger protein 75 (D8C6)	ZNF75	regulation of transcription, DNA-dependent
214525_x.at	Hs.279843	4	mutL homolog 3 (E. coli)	MLH3	mismatch repair
216199_s.at	Hs.390428	4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP3K4	activation of MAPKK // JNK cascade
220048_at	Hs.58346	4	ectodysplasin 1, anhidrotic receptor	EDAR	cell differentiation
221029_s.at	Hs.306051	4	wingless-type MMTV integration site family, member 5B	WNT5B	frizzled-2 signaling pathway
207703_at	Hs.21107	4	neuroigin 4	NLGN4	cell adhesion
207901_at	Hs.674	4	interleukin 12B	IL12B	regulation of cytokine biosynthesis // JAK-STAT cascade
213107_at	Hs.252550	4	Traf2 and NCK interacting kinase	KIAA0551	protein kinase cascade
213829_x.at	Hs.348183	4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy	TNFRSF6B	anti-apoptosis // oncogenesis

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref.ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
214021_x.at	Hs.149846	4	integrin, beta 5	ITGB5	integrin-mediated signaling pathway // cell-matrix adhesion
214421_x.at	Hs.418127	4	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	CYP2C9	electron transport
216026_s.at	Hs.436458	4	polymerase (DNA directed), epsilon	POLE	DNA repair
36004_at	Hs.43505	4	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	IKBKG	regulation of transcription // induction of apoptosis
209560_s.at	Hs.169228	4	delta-like 1 homolog (Drosophila)	DLK1	
209169_at	Hs.5422	4	glycoprotein M6B	GPM6B	
211692_s.at	Hs.87246	4	BCL2 binding component 3	BBC3	
209229_s.at	Hs.411875	4	KIAA1115 protein	KIAA1115	
219581_at	Hs.335550	4	hypothetical protein MGC2776	MGC2776	
219419_at	Hs.444642	4	hypothetical protein FLJ21172	FLJ21172	
222143_s.at	Hs.271931	4	hypothetical protein FLJ22405	FLJ22405	
217928_s.at	Hs.128218	4	chromosome 11 open reading frame 23	C11orf23	
215226_at	Hs.321583	4	Homo sapiens cDNA FLJ20779 fis, clone COL05077	—	
215825_at	Hs.283819	4	Homo sapiens clone 24487 mRNA sequence	—	
215756_at	Hs.293928	4	Homo sapiens cDNA FLJ14231 fis, clone NT2RP3004470.	—	
201230_s.at	Hs.241558	3	ariadne homolog 2 (Drosophila)	ARIH2	development
201557_at	Hs.25348	3	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	VAMP2	nonselective vesicle transport
201799_s.at	Hs.24734	3	oxysterol binding protein	OSBP	steroid metabolism // lipid transport
202067_s.at	Hs.213289	3	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	LDLR	endocytosis /// lipid transport /
202183_s.at	Hs.119324	3	kinesin family member 22	KIF22	mitosis
202494_at	Hs.22516	3	peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)	PPIE	protein folding
202964_s.at	Hs.166891	3	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)	RFX5	transcription from Pol II promoter // not recorded
203025_at	Hs.433291	3	ARD1 homolog, N-acetyltransferase (S. cerevisiae)	ARD1	DNA packaging
203090_at	Hs.118684	3	stromal cell-derived factor 2	SDF2	protein amino acid glycosylation
203394_s.at	Hs.250666	3	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	HES1	regulation of transcription, DNA-dependent
203416_at	Hs.443057	3	CD53 antigen	CD53	antimicrobial humoral response (sensu Invertebrata)
203679_at	Hs.446686	3	interleukin 1 receptor-like 1 ligand	IL1RL1LG	cell-cell signaling
203844_at	Hs.421597	3	von Hippel-Lindau syndrome	VHL	negative regulation of cell proliferation
204310_s.at	Hs.78518	3	natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B	NPR2	cGMP biosynthesis
204475_at	Hs.83169	3	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	collagen catabolism
204727_at	Hs.385998	3	AND-1 protein	AND-1	regulation of transcription
205193_at	Hs.460889	3	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	MAFF	regulation of transcription
205395_s.at	Hs.20555	3	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	MRE11A	double-strand break repair via nonhomologous end-joining /
205998_x.at	Hs.442527	3	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	CYP3A4	electron transport /
206170_at	Hs.2551	3	adrenergic, beta-2-, receptor, surface	ADRB2	adenylate cyclase activation

9 Anhang

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
206449_s.at	Hs.89983	3	mannan-binding lectin serine protease 1	MASP1	complement activation
206452_x.at	Hs.400740	3	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' (PR 53)	PPP2R4	protein amino acid dephosphorylation
206474_at	Hs.258536	3	PCTAIRE protein kinase 2	PCTK2	regulation of cell cycle /
206766_at	Hs.158237	3	integrin, alpha 10	ITGA10	integrin-mediated signaling pathway // cell-matrix adhesion
206857_s.at	Hs.407482	3	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa	FKBP1B	protein folding
207135_at	Hs.424980	3	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	HTR2A	synaptic transmission // serotonin receptor signaling pathway
207851_s.at	Hs.438669	3	insulin receptor	INSR	signal transduction
207859_s.at	Hs.96094	3	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3	CHRN3	synaptic transmission
208064_s.at	Hs.298923	3	sialyltransferase 8C	SIAT8C	carbohydrate metabolism
208240_s.at	Hs.278954	3	fibroblast growth factor 1 (acidic)	FGF1	cell-cell signaling
208813_at	Hs.597	3	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble	GOT1	amino acid metabolism
209190_s.at	Hs.511896	3	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	DIAPH1	hearing
209424_s.at	Hs.49598	3	alpha-methylacyl-CoA racemase	AMACR	metabolism
209454_s.at	Hs.203846	3	TEA domain family member 3	TEAD3	regulation of transcription from Pol II promoter
209919_x.at	Hs.352119	3	gamma-glutamyltransferase 1	GGT1	glutathione biosynthesis
210002_at	Hs.50924	3	GATA binding protein 6	GATA6	muscle development // regulation of transcription
210007_s.at	Hs.108646	3	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	GPD2	electron transport // glycerol-3-phosphate metabolism
212156_at	Hs.417482	3	vacuolar protein sorting 39 (yeast)	VPS39	intracellular protein transport
212980_at	Hs.122440	3	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)	AHSA2	transport
213654_at	Hs.26782	3	TAF5-like RNA polymerase II,	TAF5L	transcription from Pol II promoter
213732_at	Hs.371282	3	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)	TCF3	cell growth and/or maintenance
213977_s.at	Hs.23476	3	Cip1-interacting zinc finger protein	CIZ1	regulation of cell cycle
214114_x.at	Hs.75087	3	FAST kinase	FASTK	induction of apoptosis by extracellular signals
214710_s.at	Hs.23960	3	cyclin B1	CCNB1	G2/M transition of mitotic cell cycle
214731_at	Hs.131736	3	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 5	NEDD5	cell cycle
214876_s.at	Hs.370420	3	tubulin, gamma complex associated protein 5	TUBGCP5	microtubule nucleation
214979_at	Hs.90786	3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	ABCC3	transport
215425_at	Hs.77311	3	BTG family, member 3	BTG3	regulation of cell cycle
215535_s.at	Hs.409230	3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	AGPAT1	phospholipid metabolism
216537_s.at	Hs.274470	3	sialic acid binding Ig-like lectin 7	SIGLEC7	cell adhesion
217099_s.at	Hs.302421	3	gem (nuclear organelle) associated protein 4	GEMIN4	rRNA processing
36907_at	Hs.130607	3	mevalonate kinase (mevalonic aciduria)	MVK	isoprenoid biosynthesis

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref.ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
37278_at	Hs.409911	3	tafazzin	TAZ	muscle contraction // oncogenesis
91684_g_at	Hs.343589	3	exosome complex exonuclease RRP41	RRP41	rRNA processing
177_at	Hs.380819	3	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	PLD1	phospholipid metabo- lism
202407_s_at	Hs.312927	3	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (yeast)	PRPF31	
202312_s_at	Hs.172928	3	collagen, type I, alpha 1	COL1A1	epidermal differentiati- on
202580_x_at	Hs.511941	3	forkhead box M1	FOXM1	transcription from Pol II promoter // respon- se to oxidative stress
202775_s_at	Hs.213739	3	splicing factor, arginine/serine- rich 8	SFRS8	nuclear mRNA spli- cing, via spliceosome
202799_at	Hs.317335	3	ClpP caseinolytic protease, ATP- dependent, proteolytic subunit homolog (E. coli)	CLPP	proteolysis and pepti- dolysis
202870_s_at	Hs.82906	3	CDC20 cell division cycle 20 ho- molog (S. cerevisiae)	CDC20	regulation of cell cycle
202955_s_at	Hs.94631	3	brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1	BIG1	exocytosis
218529_at	Hs.333427	3	8D6 antigen	8D6A	cell-cell signaling // positive regulation of cell proliferation
219162_s_at	Hs.418450	3	mitochondrial ribosomal protein L11	MRPL11	protein biosynthesis
203683_s_at	Hs.78781	3	vascular endothelial growth fac- tor B	VEGFB	positive regulation of cell proliferation
203860_at	Hs.80741	3	propionyl Coenzyme A car- boxylase, alpha polypeptide	PCCA	fatty acid metabolism
204641_at	Hs.153704	3	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 2	NEK2	regulation of mitosis // meiosis
204919_at	Hs.408153	3	proline rich 4 (lacrimal)	PROL4	physiological processes
205141_at	Hs.283749	3	ribonuclease, RNase A family, 4	RNASE4	mRNA cleavage
205282_at	Hs.410784	3	low density lipoprotein receptor- related protein 8, apolipoprotein e receptor	LRP8	signal transduction // lipid metabolism
206316_s_at	Hs.300559	3	kinetochore associated 1	KNTC1	mitotic checkpoint// cell cycle
206613_s_at	Hs.153088	3	TATA box binding protein (TBP)-associated factor	TAF1A	transcription from Pol II promoter
207455_at	Hs.2411	3	purinergic receptor P2Y, G- protein coupled, 1	P2RY1	G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger
208957_at	Hs.154023	3	thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum)	TXNDC4	electron transport // regulation of redox ho- meostasis
209172_s_at	Hs.77204	3	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	CENPF	DNA replication and chromosome cycle
209189_at	Hs.25647	3	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	cell growth and/or maintenance
209364_at	Hs.76366	3	BCL2-antagonist of cell death	BAD	induction of apoptosis
209706_at	Hs.55999	3	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	NKX3-1	regulation of transcrip- tion, DNA-dependent
210026_s_at	Hs.57973	3	caspase recruitment domain fam- ily, member 10	CARD10	activation of NF- kappaB-inducing kinase // apoptosis
210160_at	Hs.93354	3	platelet-activating factor acetyl- hydrolase, isoform Ib, beta sub- unit 30kDa	PAFAH1B2	cell motility // lipid ca- tabolism
210255_at	Hs.100669	3	RAD51-like 1 (S. cerevisiae)	RAD51L1	meiotic recombination // DNA repair
211022_s_at	Hs.440734	3	alpha thalassemia/mental retar- dation syndrome X-linked	ATRX	DNA repair //// DNA recombination // DNA methylation
212627_s_at	Hs.254717	3	KIAA0116 protein	KIAA0116	rRNA processing

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
213020_at	Hs.124436	3	golgi SNAP receptor complex member 1	GOSR1	ER to Golgi transport
213135_at	Hs.115176	3	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	TIAM1	intracellular signaling cascade
214006_s_at	Hs.77719	3	gamma-glutamyl carboxylase	GGCX	protein modification // blood coagulation
214649_s_at	Hs.181326	3	myotubularin related protein 2	MTMR2	protein amino acid dephosphorylation
216598_s_at	Hs.303649	3	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	calcium ion homeostasis // JAK-STAT cascade
221561_at	Hs.446331	3	sterol O-acyltransferase	SOAT1	circulation //cholesterol metabolism
221643_s_at	Hs.194369	3	arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	RERE	regulation of transcription, DNA-dependent
201733_at	Hs.372528	3	chloride channel 3	CLCN3	chloride transport
203915_at	Hs.77367	3	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL9	cell-cell signaling // chemotaxis
203945_at	Hs.172851	3	arginase, type II	ARG2	urea cycle // nitric oxide biosynthesis // arginine catabolism
204043_at	Hs.417948	3	"transcobalamin II; macrocytic anemia"	TCN2	vitamin B12 transport
204371_s_at	Hs.91142	3	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	KHSRP	mRNA splicing
204742_s_at	Hs.168625	3	androgen-induced proliferation inhibitor	APRIN	cell proliferation
206038_s_at	Hs.378877	3	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	NR2C2	regulation of transcription, DNA-dependent // neurogenesis
206167_s_at	Hs.250830	3	Rho GTPase activating protein 6	ARHGAP6	Rho protein signal transduction // actin filament polymerization
206336_at	Hs.164021	3	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6	inflammatory response // chemotaxis
219326_s_at	Hs.173203	3	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1	B3GNT1	protein amino acid glycosylation
206654_s_at	Hs.282387	3	polymerase (RNA) III (DNA directed) (32kD)	RPC32	regulation of transcription from Pol III promoter
207845_s_at	Hs.410760	3	anaphase-promoting complex subunit 10	APC10	G2/M transition of mitotic cell cycle
208443_x_at	Hs.55967	3	short stature homeobox 2	SHOX2	regulation of transcription, DNA-dependent // neurogenesis
209317_at	Hs.5409	3	polymerase (RNA) I polypeptide C, 30kDa	POLR1C	transcription from Pol I promoter
210094_s_at	Hs.72249	3	par-3 partitioning defective 3 homolog (C. elegans)	PARD3	intracellular signaling cascade //asymmetric cytokinesis
210457_x_at	Hs.57301	3	high mobility group AT-hook 1	HMGA1	regulation of transcription, DNA-dependent
213409_s_at	Hs.279903	3	Ras homolog enriched in brain	RHEB	small GTPase mediated signal transduction
214377_s_at	Hs.436004	3	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	JAK1	protein amino acid phosphorylation
215541_s_at	Hs.511896	3	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	DIAPH1	hearing
217315_s_at	Hs.165296	3	kallikrein 13	KLK13	proteolysis and peptidolysis
217930_s_at	Hs.25413	3	toll interacting protein	TOLLIP	cell-cell signaling
218408_at	Hs.235750	3	translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog (yeast)	TIMM10	protein targeting //mitochondrial translocation

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref.ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
218902_at	Hs.311559	3	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	NOTCH1	development // signal transduction
220186_s_at	Hs.4205	3	protocadherin LKC	PC-LKC	homophilic cell adhesion
222377_at	Hs.454480	3	T-box 10	TBX10	regulation of transcription from Pol II promoter
37793_r_at	Hs.125244	3	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	RAD51L3	base-excision repair
201035_s_at	Hs.8110	3	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	HADHSC	
201763_s_at	Hs.336916	3	death-associated protein 6	DAXX	
201767_s_at	Hs.12124	3	elaC homolog 2 (E. coli)	ELAC2	
201883_s_at	Hs.396798	3	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1	B4GALT1	
202556_s_at	Hs.25313	3	microspherule protein 1	MCRS1	
203661_s_at	Hs.374849	3	tropomodulin 1	TMOD1	
203755_at	Hs.36708	3	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	BUB1B	
204633_s_at	Hs.109058	3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	RPS6KA5	
205296_at	Hs.87	3	retinoblastoma-like 1 (p107)	RBL1	
206816_s_at	Hs.256747	3	sperm associated antigen 8	SPAG8	
208960_s_at	Hs.285313	3	core promoter element binding protein	COPEB	
208961_s_at	Hs.285313	3	core promoter element binding protein	COPEB	
209436_at	Hs.5378	3	spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein	SPON1	
209556_at	Hs.121870	3	neurochondrin	NCDN	
210720_s_at	Hs.324104	3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 binding protein	APBA2BP	
210837_s_at	Hs.28482	3	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	PDE4D	
211584_s_at	Hs.89385	3	nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus	NPAT	
212108_at	Hs.76591	3	expressed in T-cells and eosinophils in atopic dermatitis	ETEA	
213302_at	Hs.88139	3	phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAR amidotransferase)	PFAS	
213338_at	Hs.35861	3	Ras-induced senescence 1	RIS1	
213435_at	Hs.412327	3	SATB family member 2	SATB2	
215354_s_at	Hs.409251	3	proline and glutamic acid rich nuclear protein	PELP1	
217765_at	Hs.272736	3	nuclear receptor binding protein	NRBP	
218000_s_at	Hs.82101	3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	PHLDA1	
218176_at	Hs.306123	3	melanoma antigen, family F, 1	MAGEF1	
219437_s_at	Hs.402727	3	nasopharyngeal carcinoma susceptibility protein	LZ16	
219822_at	Hs.348472	3	mitochondrial translational release factor 1	MTRF1	
221427_s_at	Hs.143601	3	cyclin L2	CCNL2	
221629_x_at	Hs.521931	3	brain protein 16	LOC51236	
221657_s_at	Hs.125037	3	ankyrin repeat and SOCS box-containing 6	ASB6	
41160_at	Hs.178728	3	methyl-CpG binding domain protein 3	MBD3	
201770_at	Hs.173255	3	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	SNRPA	
203096_s_at	Hs.373588	3	PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	PDZGEF1	
203653_s_at	Hs.966	3	coilin	COIL	
206818_s_at	Hs.438588	3	cyclin M2	CNNM2	

9 Anhang

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
207205_at	Hs.12	3	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4	CEACAM4	
207847_s_at	Hs.89603	3	mucin 1, transmembrane	MUC1	
208180_s_at	Hs.421737	3	histone 1, H4h	HIST1H4H	
209459_s_at	Hs.283675	3	NPD009 protein	NPD009	
210062_s_at	Hs.19585	3	KRAB-zinc finger protein SZF1-1	SZF1	
210625_s_at	Hs.78921	3	A kinase (PRKA) anchor protein 1	AKAP1	
212518_at	Hs.282177	3	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma	PIP5K1C	
210870_s_at	Hs.458373	3	epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)	EPM2A	
211364_at	Hs.459541	3	methylthioadenosine phosphorylase	MTAP	
211782_at	Hs.303154	3	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	IDS	
217432_s_at	Hs.303154	3	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	IDS	
220885_s_at	Hs.434229	3	centromere protein J	CENPJ	
64432_at	Hs.333120	3	carnitine deficiency-associated gene expressed in ventricle 1	CDV-1	
212336_at	Hs.437422	3	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	EPB41L1	
212723_at	Hs.72660	3	phosphatidylserine receptor	PTDSR	
205011_at	Hs.152944	3	loss of heterozygosity, 11, chromosomal region 2, gene A	LOH11CR2A	
206468_s_at	Hs.19469	3	CGI-01 protein	CGI-01	
218664_at	Hs.183646	3	nuclear receptor binding factor 1	CGI-63	
210706_s_at	Hs.30524	3	ring finger protein 24	RNF24	
221873_at	Hs.374355	3	zinc finger protein 143 (clone pHZ-1)	ZNF143	regulation of transcription from Pol II promoter
219314_s_at	Hs.250493	3	zinc finger protein 219	ZNF219	regulation of transcription, DNA-dependent
203985_at	Hs.108139	3	zinc finger protein 212	ZNF212	
208472_at	Hs.388622	3	zinc finger protein, subfamily 1A, 4 (Eos)	ZNFN1A4	
211965_at	Hs.85155	3	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1	
213221_s_at	Hs.306864	3	KIAA0781 protein	KIAA0781	protein amino acid phosphorylation
214231_s_at	Hs.405457	3	KIAA0564 protein	KIAA0564	
212487_at	Hs.396047	3	KIAA0553 protein	KIAA0553	
212380_at	Hs.202331	3	KIAA0082 protein	KIAA0082	
206102_at	Hs.360033	3	KIAA0186 gene product	KIAA0186	
215232_at	Hs.471906	3	KIAA0672 gene product	KIAA0672	
212911_at	Hs.9059	3	KIAA0962 protein	KIAA0962	electron transport
52837_at	Hs.6829	3	KIAA1644 protein	KIAA1644	
203171_s_at	Hs.511948	3	KIAA0409 protein	KIAA0409	
209256_s_at	Hs.192966	3	KIAA0265 protein	KIAA0265	
212710_at	Hs.380639	3	hypothetical protein DKFZp434G2311	—	
220295_x_at	Hs.445098	3	hypothetical protein FLJ20354	FLJ20354	intracellular signaling cascade
58994_at	Hs.269592	3	putative NFkB activating protein	FLJ20241	
218951_s_at	Hs.378766	3	hypothetical protein FLJ11323	FLJ11323	intracellular signaling cascade
206650_at	Hs.274356	3	hypothetical protein FLJ10547	FLJ10547	
215792_s_at	Hs.261134	3	hypothetical protein FLJ10737	FLJ10737	
221591_s_at	Hs.404323	3	hypothetical protein FLJ10156	FLJ10156	
220112_at	Hs.84560	3	hypothetical protein FLJ11795	FLJ11795	
209672_s_at	Hs.387140	3	hypothetical protein FLJ20323	FLJ20323	
220390_at	Hs.147377	3	hypothetical protein FLJ23598	FLJ23598	
221425_s_at	Hs.449291	3	hypothetical protein MGC4276 similar to CG8198	MGC4276	
221895_at	Hs.190043	3	hypothetical protein MGC26706	MGC26706	

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref.ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
212342_at	Hs.82719	3	hypothetical protein MGC21416	MGC21416	
213367_at	Hs.407782	3	hypothetical protein LOC155060	LOC155060	
213195_at	Hs.434386	3	hypothetical protein LOC201229	LOC201229	
32502_at	Hs.6748	3	hypothetical protein PP1665	PP1665	
216012_at	Hs.159901	3	Human unidentified mRNA, partial sequence.	—	
210703_at	Hs.419083	3	Homo sapiens PRO2259 mRNA, complete cds	—	
215445_x_at	Hs.100516	3	Homo sapiens clone 23605 mRNA sequence	—	
218280_x_at	Hs.417332	3	Homo sapiens similar to H2B histone family, member F (LOC350696), mRNA	—	
215604_x_at	Hs.443532	3	Homo sapiens cDNA FLJ13721 fis, clone PLACE2000450.	—	
216212_s_at	Hs.509389	3	Homo sapiens transcribed sequences	—	
217629_at	Hs.446662	3	Homo sapiens transcribed sequence with strong similarity to protein ref:NP_057175.1	—	
206274_s_at	Hs.512855	3	Homo sapiens medulloblastoma antigen MU-MB-2.42 mRNA, partial cds	—	
217052_x_at	Hs.444689	3	Homo sapiens cDNA FLJ14046 fis, clone HEMBA1006461.	—	
218183_at	Hs.7765	3	chromosome 16 open reading frame 5	C16orf5	
203550_s_at	Hs.348308	3	chromosome 1 open reading frame 2	C1orf2	
218572_at	Hs.279761	3	chromosome 14 open reading frame 123	C14orf123	
218578_at	Hs.259502	3	chromosome 1 open reading frame 28	C1orf28	
216374_at	— // —	3	—	—	
217393_x_at	— // —	3	—	—	
216606_x_at	— // —	3	—	—	
221717_at	— // —	3	—	—	
B					
214131_at	Hs.145010	-5	chromosome Y open reading frame 15B	CYorf15B	
204291_at	Hs.29878	-5	KIAA0335 gene product	KIAA0335	
44669_at	Hs.356460	-5	Homo sapiens LOC163182 (LOC163182), mRNA	—	
201072_s_at	Hs.162086	-4	SWI/SNF related, matrix assoc., actin dep. reg. of chromatin, subfamily c,1	SMARCC1	chromatin assembly/disassembly
201693_s_at	Hs.326035	-4	early growth response 1	EGR1	regulation of transcription, DNA-dependent
202046_s_at	Hs.102548	-4	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	GRLF1	transcription
205354_at	Hs.81131	-4	guanidinoacetate N-methyltransferase	GAMT	muscle contraction // creatine biosynthesis
205503_at	Hs.512667	-4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14	PTPN14	protein amino acid dephosphorylation
206108_s_at	Hs.6891	-4	splicing factor, arginine/serine-rich 6	SFRS6	nuclear mRNA splicing, via spliceosome
207732_s_at	Hs.11101	-4	discs, large homolog 3 (neuroendocrine-dlg, Drosophila)	DLG3	negative regulation of cell proliferation
209936_at	Hs.439480	-4	RNA binding motif protein 5	RBM5	RNA processing // negative regulation of cell cycle
213501_at	Hs.379991	-4	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	ACOX1	electron transport // fatty acid beta-oxidation
214298_x_at	Hs.90998	-4	septin 6	38961	cytokinesis // cell cycle
214314_s_at	Hs.158688	-4	translation initiation factor IF2	IF2	regulation of translational initiation

9 Anhang

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
215623_x.at	Hs.50758	-4	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	SMC4L1	mitotic chromosome condensation // cell cycle
217547_x.at	Hs.264345	-4	TRAF6-inhibitory zinc finger protein	TIZ	regulation of transcription, DNA-dependent
220115_s.at	Hs.92489	-4	cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	CDH10	homophilic cell adhesion
203593.at	Hs.374340	-4	CD2-associated protein	CD2AP	protein complex assembly
205359.at	Hs.419136	-4	A kinase (PRKA) anchor protein 6	AKAP6	protein targeting
209717.at	Hs.387251	-4	ecotropic viral integration site 5	EVI5	development // cell proliferation
210198_s.at	Hs.1787	-4	proteolipid protein 1	PLP1	synaptic transmission
213899.at	Hs.144906	-4	methionyl aminopeptidase 2	METAP2	protein modification
214587.at	Hs.114599	-4	collagen, type VIII, alpha 1	COL8A1	somatic muscle development
214701_s.at	Hs.418138	-4	fibronectin 1	FN1	cell motility // signal transduction
215643.at	Hs.187319	-4	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, (semaphorin) 3D	SEMA3D	neurogenesis
216938_x.at	Hs.73893	-4	dopamine receptor D2	DRD2	signal transduction // dopamine receptor
219746.at	Hs.440523	-4	D4, zinc and double PHD fingers, family 3	DPF3	regulation of transcription, DNA-dependent
36830.at	Hs.68583	-4	mitochondrial intermediate peptidase	MIPEP	proteolysis and peptidolysis // mitochondrial processing
206046.at	Hs.432317	-4	a disintegrin and metalloproteinase domain 23	ADAM23	central nervous system development // proteolysis and peptidolysis
206653.at	Hs.282387	-4	polymerase (RNA) III (DNA directed) (32kD)	RPC32	regulation of transcription from Pol III promoter
208441.at	Hs.239176	-4	insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	signal transduction // anti-apoptosis
211815_s.at	Hs.87726	-4	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3	GGA3	intracellular protein transport // intra-Golgi transport
202970.at	Hs.173135	-4	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	DYRK2	
205231_s.at	Hs.458373	-4	epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)	EPM2A	
210852_s.at	Hs.433075	-4	aminoadipate-semialdehyde synthase	AASS	
214953_s.at	Hs.177486	-4	amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	APP	
215082.at	Hs.343667	-4	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids	ELOVL5	
217477.at	Hs.297604	-4	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	PIP5K1B	
219577_s.at	Hs.134514	-4	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	ABCA7	
219860.at	Hs.246845	-4	lymphocyte antigen 6 complex, locus G5C	LY6G5C	
221290_s.at	Hs.454758	-4	melanoma ubiquitous mutated protein	MUM-1	
203724_s.at	Hs.7972	-4	rap2 interacting protein x	RIPX	
217427_s.at	Hs.415735	-4	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)	HIRA	
220290.at	Hs.128738	-4	absent in melanoma 1-like	AIM1L	
222237_s.at	Hs.48589	-4	zinc finger protein 228	ZNF228	regulation of transcription, DNA-dependent

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
206900_x.at	Hs.407162	-4	hypothetical protein BC014148	LOC114977	
204665.at	Hs.24808	-4	hypothetical protein FLJ21168	FLJ21168	
218858.at	Hs.87729	-4	hypothetical protein FLJ12428	FLJ12428	intracellular signaling cascade
219441_s.at	Hs.413386	-4	hypothetical protein FLJ23119	FLJ23119	
212323_s.at	Hs.194737	-4	hypothetical protein FLJ10619	FLJ10619	
218993.at	Hs.182729	-4	putative RNA methyltransferase	FLJ10581	
222250_s.at	Hs.385548	-4	DKFZP434B168 protein	—	
220853.at	Hs.278931	-4	PRO0159 protein	PRO0159	
76897_s.at	Hs.522351	-4	KIAA0674 protein	KIAA0674	protein folding
213984.at	Hs.31921	-4	KIAA0648 protein	KIAA0648	
214098.at	Hs.21554	-4	KIAA1107 protein	KIAA1107	
216110_x.at	Hs.470604	-4	Homo sapiens cDNA FLJ14080 fis, clone HEMBB1002152.	—	
216153_x.at	Hs.459631	-4	Homo sapiens cDNA FLJ12835 fis, clone NT2RP2003165.	—	
215221.at	Hs.306758	-4	Homo sapiens cDNA: FLJ21411 fis, clone COL03986	—	
216155.at	Hs.306686	-4	Homo sapiens cDNA: FLJ20890 fis, clone ADKA03323	—	
215447.at	Hs.516578	-4	"Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586J0323"	—	
213986_s.at	Hs.380962	-4	chromosome 19 open reading frame 6	C19orf6	
215985.at	Hs.153618	-4	Homo sapiens cDNA FLJ30561 fis, clone BRAWH2004580.	—	
215999.at	Hs.454698	-4	chromosome 17 open reading frame 1A	C17orf1A	
218431.at	Hs.16157	-4	chromosome 14 open reading frame 133	C14orf133	
219164_s.at	Hs.168241	-4	chromosome 14 open reading frame 103	C14orf103	
217406.at		-4	—	—	
217313.at		-4	—	—	
201936_s.at	Hs.402697	-3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	EIF4G3	protein biosynthesis
201998.at	Hs.2554	-3	sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)	SIAT1	humoral immune response // protein amino acid glycosylation
202040_s.at	Hs.76272	-3	retinoblastoma binding protein 2	RBBP2	transcription from Pol II promoter
202147_s.at	Hs.7879	-3	interferon-related developmental regulator 1	IFRD1	myoblast cell fate determination
202823.at	Hs.435169	-3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	TCEB1	regulation of transcription from Pol II promoter
203359_s.at	Hs.78221	-3	c-myc binding protein	MYCBP	regulation of transcription, DNA-dependent
203515_s.at	Hs.30954	-3	phosphomevalonate kinase	PMVK	cholesterol biosynthesis
203868_s.at	Hs.109225	-3	vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	cell-cell adhesion
203870.at	Hs.109268	-3	ubiquitin specific protease 46	USP46	ubiquitin-dependent protein catabolism
203971.at	Hs.414471	-3	solute carrier family 31 (copper transporters), member 1	SLC31A1	copper ion transport
204863_s.at	Hs.71968	-3	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	cell surface receptor linked signal transduction // immune response
205197_s.at	Hs.606	-3	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide (Menkes syndrome)	ATP7A	metal ion transport
205865.at	Hs.437783	-3	dead ringer-like 1 (Drosophila)	DRIL1	regulation of transcription, DNA-dependent
205893.at	Hs.71132	-3	neuroligin 1	NLGN1	calcium-dependent cell-cell adhesion
206472_s.at	Hs.287362	-3	transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE3	regulation of transcription, DNA-dependent

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
206734_at	Hs.105940	-3	jerky homolog-like (mouse)	JRKL	central nervous system development
206773_at	Hs.159590	-3	lymphocyte antigen 6 complex, locus H	LY6H	cellular defense response
207131_x_at	Hs.352119	-3	gamma-glutamyltransferase 1	GGT1	glutathione biosynthesis
207181_s_at	Hs.9216	-3	caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	CASP7	apoptotic program
207687_at	Hs.374664	-3	inhibin, beta C	INHBC	cell growth and/or maintenance
203215_s_at	Hs.118483	-3	myosin VI	MYO6	hearing
207780_at	Hs.3232	-3	cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2	CYLC2	spermatogenesis
208403_x_at	Hs.42712	-3	MAX protein	MAX	transcription from Pol II promoter // oncogenesis
208741_at	Hs.23964	-3	sin3-associated polypeptide, 18kDa	SAP18	regulation of transcription from Pol II promoter
209212_s_at	Hs.84728	-3	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	KLF5	transcription from Pol II promoter
209681_at	Hs.30246	-3	solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	SLC19A2	small molecule transport
209827_s_at	Hs.170359	-3	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	IL16	intracellular signaling cascade
209911_x_at	Hs.180779	-3	histone 1, H2bd	HIST1H2BD	nucleosome assembly
209964_s_at	Hs.108447	-3	spinocerebellar ataxia 7 (olivopontocerebellar atrophy with retinal degeneration)	SCA7	nuclear organization and biogenesis
210042_s_at	Hs.252549	-3	cathepsin Z	CTSZ	proteolysis and peptidolysis
210210_at	Hs.14891	-3	myelin protein zero-like 1	MPZL1	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
210461_s_at	Hs.442540	-3	actin binding LIM protein 1	ABLIM1	cytoskeleton organization and biogenesis
210651_s_at	Hs.125124	-3	EphB2	EPHB2	signal transduction // oncogenesis
210665_at	Hs.102301	-3	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	TFPI	blood coagulation
210793_s_at	Hs.112255	-3	nucleoporin 98kDa	NUP98	intracellular protein transport // protein-nucleus import
210930_s_at	Hs.446352	-3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2,	ERBB2	cell growth and/or maintenance // oncogenesis
210985_s_at	Hs.371696	-3	nuclear antigen Sp100	SP100	regulation of transcription, DNA-dependent
211081_s_at	Hs.246970	-3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	MAP4K5	protein kinase cascade // activation of JUNK
211356_x_at	Hs.23581	-3	leptin receptor	LEPR	energy reserve metabolism
211594_s_at	Hs.288936	-3	mitochondrial ribosomal protein L9	MRPL9	protein biosynthesis
211883_x_at	Hs.512682	-3	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	CEACAM1	immune response
212073_at	Hs.446484	-3	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	CSNK2A1	signal transduction
212321_at	Hs.186613	-3	sphingosine-1-phosphate lyase 1	SGPL1	amino acid metabolism
213209_at	Hs.131846	-3	TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor	TAF6L	chromatin modeling // regulation of transcription from Pol II promoter
213252_at	Hs.146233	-3	neuralized-like (Drosophila)	NEURL	neurogenesis

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref.ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
217573_at	Hs.436980	-3	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C	GRIN2C	ion transport
217591_at	Hs.272108	-3	SKI-like	SKIL	cell differentiation // cell growth and/or maintenance
217787_s_at	Hs.307582	-3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	GALNT2	O-linked glycosylation
217799_x_at	Hs.372758	-3	ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	UBE2H	ubiquitin cycle
218202_x_at	Hs.203559	-3	mitochondrial ribosomal protein L44	MRPL44	RNA processing
219077_s_at	Hs.519	-3	WW domain containing oxidoreductase	WVOX	steroid metabolism
220735_s_at	Hs.30443	-3	sentrin/SUMO-specific protease	SEN7	protein sumoylation
221060_s_at	Hs.174312	-3	toll-like receptor 4	TLR4	activation of NF-kappaB-inducing kinase // regulation of IL-6 biosynthesis
221840_at	Hs.437980	-3	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	PTPRE	protein amino acid dephosphorylation
222029_x_at	Hs.446374	-3	HLA class II region expressed gene KE2	HKE2	protein folding
1316_at	Hs.724	-3	thyroid hormone receptor, alpha	THRA	regulation of transcription, DNA-dependent
201242_s_at	Hs.78629	-3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	potassium ion transport // sodium ion transport
201838_s_at	Hs.6232	-3	SPTF-associated factor 65 gamma	STAF65	regulation of transcription, DNA-dependent
202056_at	Hs.161008	-3	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)	KPNA1	intracellular protein transport // regulation of DNA recombination
202669_s_at	Hs.30942	-3	ephrin-B2	EFNB2	neurogenesis // cell-cell signaling
203279_at	Hs.154332	-3	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	EDEM1	
203567_s_at	Hs.511746	-3	tripartite motif-containing 38	TRIM38	
203741_s_at	Hs.172199	-3	adenylate cyclase 7	ADCY7	cAMP biosynthesis
203932_at	Hs.1162	-3	major histocompatibility complex, class II, DM beta	HLA-DMB	immune response
203951_at	Hs.21223	-3	calponin 1, basic, smooth muscle	CNN1	smooth muscle contraction
204024_at	Hs.436445	-3	chromosome 8 open reading frame 1	C8orf1	germ-cell development // meiosis
204044_at	Hs.335116	-3	quinolinate phosphoribosyltransferase	QPRT	synaptic transmission // energy pathways // nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
204347_at	Hs.10862	-3	adenylate kinase 3	AK3	
204530_s_at	Hs.439767	-3	thymus high mobility group box protein TOX	TOX	regulation of transcription, DNA-dependent
204689_at	Hs.118651	-3	hematopoietically expressed homeobox	HHEX	regulation of transcription, DNA-dependent
204812_at	Hs.13512	-3	ZW10 homolog, centromere/kinetochore protein (Drosophila)	ZW10	mitotic checkpoint / cell cycle
205027_s_at	Hs.432453	-3	mitogen-activated protein kinase kinase 8	MAP3K8	cell growth and/or maintenance
205410_s_at	Hs.343522	-3	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	ATP2B4	cation transport // calcium ion transport
203227_s_at	Hs.50984	-3	sarcoma amplified sequence	SAS	positive regulation of cell proliferation
203377_s_at	Hs.116674	-3	cell division cycle 40 homolog (yeast)	CDC40	mRNA splicing

9 Anhang

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
205799_s.at	Hs.239106	-3	solute carrier family 3	SLC3A1	carbohydrate metabolism // L-cystine transport
205934_at	Hs.153322	-3	phospholipase C-like 1	PLCL1	lipid metabolism
205964_at	Hs.324978	-3	zinc finger protein 426	ZNF426	regulation of transcription, DNA-dependent
206031_s.at	Hs.3759	-3	ubiquitin specific protease 5 (isopeptidase T)	USP5	ubiquitin-dependent protein catabolism
206086_x.at	Hs.233325	-3	hemochromatosis	HFE	iron ion homeostasis
207951_at	Hs.2242	-3	casein beta	CSN2	calcium ion transport
208047_s.at	Hs.107474	-3	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	NAB1	regulation of transcription, DNA-dependent
208261_x.at	Hs.282275	-3	interferon, alpha 10	IFNA10	defense response
208478_s.at	Hs.159428	-3	BCL2-associated X protein	BAX	negative regulation of survival gene products
208578_at	Hs.250443	-3	sodium channel, voltage-gated, type X, alpha	SCN10A	sodium ion transport
208995_s.at	Hs.77965	-3	peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	PPIG	mRNA splicing
209211_at	Hs.84728	-3	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	KLF5	regulation of transcription, DNA-dependent
209238_at	Hs.82240	-3	syntaxin 3A	STX3A	intracellular protein transport // neurotransmitter transport
209781_s.at	Hs.13565	-3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3	KHDRBS3	spermatogenesis
209951_s.at	Hs.110299	-3	mitogen-activated protein kinase kinase 7	MAP2K7	response to stress
210271_at	Hs.322431	-3	neurogenic differentiation 2	NEUROD2	regulation of transcription from Pol II promoter
211263_s.at	Hs.117874	-3	paired basic amino acid cleaving system 4	PACE4	cell-cell signaling // proteolysis and peptidolysis
211339_s.at	Hs.211576	-3	IL2-inducible T-cell kinase	ITK	cellular defense response // intracellular signaling cascade
201187_s.at	Hs.77515	-3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	ITPR3	Calcium channels
202662_s.at	Hs.512235	-3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	ITPR2	Calcium channels
211551_at	Hs.77432	-3	epidermal growth factor receptor	EGFR	EGF receptor signaling pathway // cell proliferation
211833_s.at	Hs.159428	-3	BCL2-associated X protein	BAX	negative regulation of survival gene products // induction of apoptosis
213552_at	Hs.183006	-3	glucuronyl C5-epimerase	GLCE	heparan sulfate proteoglycan biosynthesis
213704_at	Hs.78948	-3	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	RABGGTB	protein modification
214474_at	Hs.50732	-3	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	PRKAB2	signal transduction// fatty acid biosynthesis
216809_at	Hs.444230	-3	cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 1	CYLC1	spermatogenesis
217829_s.at	Hs.12820	-3	ubiquitin specific protease 39	USP39	spliceosome assembly
218080_x.at	Hs.12899	-3	Fas (TNFRSF6) associated factor 1	FAF1	apoptosis
219226_at	Hs.416108	-3	CDC2-related protein kinase 7	CRK7	protein amino acid phosphorylation
219282_s.at	Hs.279746	-3	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	TRPV2	cation transport
220460_at	Hs.47261	-3	solute carrier family 21 (organic anion transporter), member 14	SLC21A14	ion transport

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref.ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
221006_s.at	Hs.67619	-3	sorting nexin family member 27	SNX27	intracellular protein transport// intracellular signaling cascade
221238.at	Hs.282204	-3	nucleosomal binding protein 1	NSBP1	regulation of transcription, DNA-dependent
320.at	Hs.301636	-3	peroxisomal biogenesis factor 6	PEX6	protein-peroxisome targeting
36475.at	Hs.54609	-3	glycine C-acetyltransferase (2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase)	GCAT	heme biosynthesis
37950.at	Hs.433986	-3	prolyl endopeptidase	PREP	proteolysis and peptidolysis
44673.at	Hs.31869	-3	sialoadhesin	SN	heterophilic cell adhesion // cell-matrix adhesion
823.at	Hs.80420	-3	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	CX3CL1	immune response // cell-cell signaling // cell adhesion
200913.at	Hs.17883	-3	protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform	PPM1G	cell cycle arrest
202085.at	Hs.75608	-3	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	TJP2	intracellular signaling cascade
202464_s.at	Hs.195471	-3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3	metabolism // fructose 2,6-bisphosphate metabolism
203458.at	Hs.301540	-3	sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase)	SPR	metabolism // tetrahydrobiopterin biosynthesis
203543_s.at	Hs.150557	-3	basic transcription element binding protein 1	BTEB1	regulation of transcription from Pol II promoter
203685.at	Hs.79241	-3	B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	anti-apoptosis // regulation of cell cycle
203700_s.at	Hs.436020	-3	deiodinase, iodothyronine, type II	DIO2	thyroid hormone generation
204247_s.at	Hs.166071	-3	cyclin-dependent kinase 5	CDK5	cell cycle
205132.at	Hs.118127	-3	actin, alpha, cardiac muscle	ACTC	muscle development
208048.at	Hs.1080	-3	tachykinin receptor 1	TACR1	G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger
208306_x.at	Hs.308026	-3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3	HLA-DRB3	signal transduction
211368_s.at	Hs.2490	-3	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	signal transduction // apoptosis
211519_s.at	Hs.69360	-3	kinesin family member 2C	KIF2C	mitosis // cell proliferation
211780_x.at	Hs.74617	-3	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	DCTN1	mitosis // neurogenesis
212172.at	Hs.294008	-3	adenylate kinase 2	AK2	
213479.at	Hs.3281	-3	neuronal pentraxin II	NPTX2	regulation of synapse // heterophilic cell adhesion
213805.at	Hs.19385	-3	abhydrolase domain containing 5	ABHD5	proteolysis and peptidolysis // inferred from electronic annotation
214043.at	Hs.323079	-3	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	PTPRD	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway
222187_x.at	Hs.48549	-3	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	G3BP	protein-nucleus import // RAS protein signal transduction
50400.at	Hs.292503	-3	peroxisomal N1-acetylspermine/spermidine oxidase	PAO	electron transport
200612_s.at	Hs.370123	-3	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	AP2B1	

9 Anhang

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
202743_at	Hs.372548	-3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	PIK3R3	
201122_x_at	Hs.310621	-3	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	
201813_s_at	Hs.115740	-3	TBC1 domain family, member 5	TBC1D5	
202062_s_at	Hs.181300	-3	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	SEL1L	
205001_s_at	Hs.99120	-3	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	DDX3Y	
205559_s_at	Hs.288931	-3	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	PCSK5	
208241_at	Hs.172816	-3	neuregulin 1	NRG1	
209037_s_at	Hs.155119	-3	EH-domain containing 1	EHD1	
209754_s_at	Hs.11355	-3	thymopoietin	TMPO	
210005_at	Hs.82285	-3	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	GART	
210172_at	Hs.440835	-3	splicing factor 1	SF1	
210540_s_at	Hs.13225	-3	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4	B4GALT4	
210867_at	Hs.20423	-3	CCR4-NOT transcription complex, subunit 4	CNOT4	
211521_s_at	Hs.7189	-3	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 4	PSCD4	
212490_at	Hs.433540	-3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 8	DNAJC8	
213332_at	Hs.293896	-3	placenta-specific 3	PLAC3	
214707_x_at	Hs.97393	-3	Alstrom syndrome 1	ALMS1	
215987_at	Hs.373588	-3	PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	PDZGEF1	
219064_at	Hs.245326	-3	inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain precursor 5	ITIH5	
219194_at	Hs.444359	-3	sema domain, immunoglobulin domain (Ig)	SEMA4G	
219376_at	Hs.126280	-3	hypothetical protein FLJ23393	FLJ23393	
219433_at	Hs.186424	-3	BCL6 co-repressor	BCOR	
219509_at	Hs.238756	-3	myozenin 1	MYOZ1	
219539_at	Hs.143818	-3	gem (nuclear organelle) associated protein 6	GEMIN6	
219928_s_at	Hs.511983	-3	calcium-binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated (fibrousheathin 2)	CABYR	
219938_s_at	Hs.413501	-3	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	PSTPIP2	
220238_s_at	Hs.376793	-3	SBBI26 protein	SBBI26	
221430_s_at	Hs.267120	-3	dactylidin	—	
39582_at	Hs.386952	-3	cylindromatosis (turban tumor syndrome)	CYLD	
203106_s_at	Hs.413840	-3	vacuolar protein sorting 41 (yeast)	VPS41	
200988_s_at	Hs.152978	-3	"proteasome (prosome, macro-pain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)"	PSME3	
204491_at	Hs.28482	-3	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	PDE4D	
207357_s_at	Hs.13785	-3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	GALNT10	
209399_at	Hs.371350	-3	holocarboxylase synthetase	HLCS	
209821_at	Hs.348390	-3	DVS27-related protein	DVS27	
210286_s_at	Hs.250072	-3	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	SLC4A7	

9.1 Gesamtliste aller IRA-regulierten Gene aus den Microarray-Analysen

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
212106_at	Hs.76591	-3	expressed in T-cells and eosinophils in atopic dermatitis	ETEA	
212379_at	Hs.82285	-3	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	GART	
212425_at	Hs.31218	-3	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	
213572_s_at	Hs.381167	-3	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	SERPINB1	
213815_x_at	Hs.128425	-3	NY-REN-24 antigen	NY-REN-24	
214417_s_at	Hs.81073	-3	fetuin B	FETUB	
214697_s_at	Hs.374634	-3	ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)	ROD1	
215529_x_at	Hs.322903	-3	disco-interacting protein 2 (Drosophila) homolog	DIP2	
215566_x_at	Hs.413781	-3	lysophospholipase II	LYPLA2	
216352_x_at	Hs.283794	-3	protocadherin gamma subfamily C, 3	PCDHGC3	
217909_s_at	Hs.383019	-3	transcription factor-like 4	TCFL4	
218173_s_at	Hs.415895	-3	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	WHSC1L1	
218255_s_at	Hs.247186	-3	fibrosin 1	FBS1	
219870_at	Hs.189813	-3	activating transcription factor 7 interacting protein 2	ATF7IP2	
219985_at	Hs.462270	-3	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	HS3ST3A1	
220171_x_at	Hs.283709	-3	lipopolysaccharide specific response-7 protein	LSR7	
220944_at	Hs.58356	-3	peptidoglycan recognition protein-I-beta precursor	PGLYRP1beta	
212839_s_at	Hs.288178	-3	Sjogren syndrome antigen A2 (60kDa, ribonucleoprotein autoantigen SS-A/Ro)	SSA2	
39313_at	Hs.275999	-3	protein kinase, lysine deficient 1	PRKWNK1	
201943_s_at	Hs.5057	-3	carboxypeptidase D	CPD	
203742_s_at	Hs.512707	-3	thymine-DNA glycosylase	TDG	
205298_s_at	Hs.91813	-3	butyrophilin, subfamily 2, member A2	BTN2A2	
208103_s_at	Hs.385913	-3	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	ANP32E	
212306_at	Hs.108614	-3	cytoplasmic linker associated protein 2	CLASP2	
205855_at	Hs.157035	-3	zinc finger protein 197	ZNF197	
210282_at	Hs.315241	-3	zinc finger protein 198	ZNF198	
216983_s_at	Hs.279855	-3	zinc finger protein 224	ZNF224	regulation of transcription, DNA-dependent
50376_at	Hs.24545	-3	zinc finger protein 444	ZNF444	
78330_at	Hs.174193	-3	zinc finger protein 335	ZNF335	
214678_x_at	Hs.2074	-3	zinc finger protein, X-linked	ZFX	regulation of transcription, DNA-dependent
213934_s_at	Hs.376810	-3	zinc finger protein 23 (KOX 16)	ZNF23	regulation of transcription, DNA-dependent
214878_at	Hs.512718	-3	zinc finger protein 37a (KOX 21)	ZNF37A	regulation of transcription, DNA-dependent
215012_at	Hs.188662	-3	zinc finger protein 451	ZNF451	
217649_at	Hs.406096	-3	zinc finger protein 216	ZNF216	
210876_at	Hs.518908	-3	Human lipocortin (LIP) 2 pseudogene mRNA, complete cds-like region.	—	
202972_s_at	Hs.442818	-3	family with sequence similarity 13, member A1	FAM13A1	
202128_at	Hs.434432	-3	KIAA0317 gene product	KIAA0317	ubiquitin cycle
203051_at	Hs.22109	-3	KIAA0945 protein	KIAA0945	
212289_at	Hs.388877	-3	KIAA0874 protein	KIAA0874	
214943_s_at	Hs.511939	-3	KIAA0117 protein	KIAA0117	
215651_at	Hs.306864	-3	KIAA0781 protein	KIAA0781	protein amino acid phosphorylation

Ref_ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
200616_s.at	Hs.181418	-3	KIAA0152 gene product	KIAA0152	
212427_at	Hs.445255	-3	KIAA0368 protein	KIAA0368	
212548_s.at	Hs.169600	-3	KIAA0826 protein	KIAA0826	
215584_at	Hs.428547	-3	HECT type E3 ubiquitin ligase	KIAA0322	ubiquitin cycle
215750_at	Hs.474916	-3	KIAA1659 protein	KIAA1659	
216775_at	Hs.135457	-3	KIAA1350 protein	KIAA1350	
215331_at	Hs.225968	-3	KIAA1000 protein	KIAA1000	
221874_at	Hs.104696	-3	KIAA1324 protein	KIAA1324	
209912_s.at	Hs.505758	-3	KIAA0415 gene product	KIAA0415	
213271_s.at	Hs.348982	-3	KIAA1117 protein	KIAA1117	
207734_at	Hs.272794	-3	hypothetical protein FLJ20340	LAX	
203224_at	Hs.37558	-3	hypothetical protein FLJ11149	FLJ11149	vitamin B2 biosynthe- sis
213381_at	Hs.279639	-3	hypothetical protein FLJ31737	FLJ31737	
219558_at	Hs.371148	-3	hypothetical protein FLJ20986	FLJ20986	cation transport
220720_x.at	Hs.287640	-3	hypothetical protein FLJ14346	FLJ14346	
221986_s.at	Hs.246875	-3	hypothetical protein FLJ20059	FLJ20059	
205584_at	Hs.169078	-3	hypothetical protein FLJ23018	FLJ23018	
218910_at	Hs.319088	-3	hypothetical protein FLJ10375	FLJ10375	
219234_x.at	Hs.20999	-3	hypothetical protein FLJ23142	FLJ23142	
219846_at	Hs.399846	-3	hypothetical protein FLJ20203	FLJ20203	
219980_at	Hs.407155	-3	hypothetical protein FLJ21106	FLJ21106	
220137_at	Hs.333157	-3	hypothetical protein FLJ20674	FLJ20674	
220348_at	Hs.287872	-3	hypothetical protein FLJ14106	FLJ14106	
220453_at	Hs.263081	-3	hypothetical protein FLJ20320	FLJ20320	
52285_f.at	Hs.236940	-3	hypothetical protein FLJ12542	FLJ12542	
65493_at	Hs.17230	-3	hypothetical protein FLJ22087	FLJ22087	
220908_at	Hs.383206	-3	hypothetical protein FLJ32855	FLJ32855	
206441_s.at	Hs.351327	-3	hypothetical protein FLJ20452	FLJ20452	
213703_at	Hs.446532	-3	hypothetical protein LOC150759	LOC150759	
213372_at	Hs.368305	-3	hypothetical protein LOC152559	LOC152559	
219387_at	Hs.254122	-3	hypothetical protein LOC55580	LOC55580	
205310_at	Hs.128702	-3	hypothetical protein 20D7-FC4	20D7-FC4	
214711_at	Hs.441127	-3	hypothetical protein 15E1.2	15E1.2	
222120_at	Hs.132227	-3	hypothetical protein MGC13138	MGC13138	regulation of transcrip- tion
58916_at	Hs.17296	-3	hypothetical protein MGC2376	MGC2376	potassium ion trans- port
204225_at	Hs.222874	-3	hypothetical protein MGC16025	MGC16025	
218642_s.at	Hs.436913	-3	hypothetical protein MGC2217	MGC2217	
222208_s.at	Hs.415497	-3	hypothetical protein MGC13098	MGC13098	transcription
218565_at	Hs.224137	-3	hypothetical protein HSPC109	HSPC109	
212731_at	Hs.11506	-3	Human clone 23589 mRNA se- quence	—	
217446_x.at	Hs.274517	-3	Homo sapiens similar to F-box domain containing protein fami- ly member	—	
216751_at	Hs.306715	-3	Homo sapiens LOC284041 (LOC284041), mRNA	—	
213089_at	Hs.166361	-3	Homo sapiens LOC340111 (LOC340111), mRNA	—	
214983_at	Hs.433656	-3	Homo sapiens LOC347571 (LOC347571), mRNA	—	
213804_at	Hs.182577	-3	Homo sapiens cDNA FLJ35942 fis, clone TEST12011712.	—	
215029_at	Hs.293563	-3	"Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586E2317 (from clone DKFZp586E2317)"	—	
215057_at	Hs.92683	-3	Homo sapiens clone 161455 breast expressed mRNA from chromosome X.	—	
215191_at	Hs.278648	-3	Homo sapiens cDNA FLJ14085 fis, clone HEMBB1002534.	—	
215306_at	Hs.468490	-3	"Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586N2020 (from clone DKFZp586N2020)"	—	

9.2 Häufigkeitsverteilung der predicted Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Ref.ID	Unigen-Nr.	x-fach REGU- LIERT	Gen	Symbol	Gene Ontology - Biological Function
216147_at	Hs.306504	-3	"Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761L23121 (from clone DKFZp761L23121)"	—	
216783_at	Hs.306815	-3	Homo sapiens cDNA: FLJ21899 fis, clone HEP03467	—	
60794_f.at	Hs.408934	-3	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6653606, partial cds	—	
222326_at	Hs.432534	-3	Homo sapiens transcribed sequences	—	
215545_at	Hs.469871	-3	Homo sapiens cDNA FLJ14123 fis, clone MAMMA1002155.	—	
215555_at	Hs.273099	-3	Homo sapiens cDNA FLJ13712 fis, clone PLACE2000394.	—	
217695_x.at	Hs.343402	-3	Homo sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_060312.1	—	
215608_at	Hs.439648	-3	Homo sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_060312.1	—	
221988_at	Hs.515232	-3	Homo sapiens transcribed sequence with moderate similarity to protein ref:NP_071431.1	—	
221796_at	Hs.494313	-3	Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1630957	—	
222180_at	Hs.225729	-3	Homo sapiens cDNA FLJ14122 fis, clone MAMMA1002033.	—	
216176_at	Hs.306802	-3	Homo sapiens cDNA: FLJ21690 fis, clone COL09538	—	
212109_at	Hs.437433	-3	chromosome 16 open reading frame 34	C16orf34	
215241_at	Hs.91791	-3	chromosome 11 open reading frame 25	C11orf25	
220688_s.at	Hs.463797	-3	chromosome 1 open reading frame 33	C1orf33	
222344_at	Hs.508741	-3	chromosome 5 open reading frame 13	C5orf13	
211074_at		-3	—	—	
216437_at		-3	—	—	
216443_at		-3	—	—	
216557_x.at		-3	—	—	
207755_at		-3	—	—	

9.2 Häufigkeitsverteilung der predicted Transkriptionsfaktor-Bindestellen

Tabelle 9.2: Gesamtübersicht Transkriptionsfaktor-Bindestellen-Häufigkeiten. Verteilung der Transkriptionsfaktor-Bindestellen bei IRA-regulierten und nicht-regulierten Genen, die in der Promoterdatenbank MPromDB annotiert sind. Die angegebenen Häufigkeiten beziehen sich auf das Vorkommen bei x Genen.

predicted transcription factor binding sites	AUFREGULIERT	ABREGULIERT	unreguliert ABSENT	unreguliert PRESENT
V\$ZTA_Q2	0	1	0	0
V\$ZIC3_01	10	7	10	10
V\$ZIC2_01	11	14	16	0
V\$ZIC1_01	10	7	10	10
V\$ZF5_B	0	1	0	0
V\$ZF5_01	103	116	108	112
V\$YY1_Q6	18	20	18	36
V\$XPF1_Q6	13	16	15	11

9 Anhang

predicted trans- cription factor binding sites	AUFREGULIERT	ABREGULIERT	unreguliert ABSENT	unreguliert PRESENT
V\$XFD3_01	0	0	0	1
V\$XFD2_01	1	0	0	0
V\$VMYB_02	1	3	1	0
V\$VMYB_01	0	0	1	0
V\$VBP_01	2	0	1	0
V\$USF2_Q6	97	94	113	91
V\$USF_Q6	2	1	6	4
V\$USF_C	27	19	31	0
V\$TTF1_Q6	2	4	2	4
V\$TST1_01	0	0	0	1
V\$TITF1_Q3	2	3	2	4
V\$TGIF_01	10	7	7	7
V\$TFIIL_Q6	88	92	105	90
V\$TFIIA_Q6	0	1	0	2
V\$TEL2_Q6	11	9	14	10
V\$TEF1_Q6	146	158	153	144
V\$TEF_Q6	0	0	2	1
V\$TCF4_Q5	56	41	49	44
V\$TCF1P_Q6	7	7	9	0
V\$TCF11_01	5	4	8	4
V\$TBP_Q6	87	102	78	72
V\$TBP_01	56	65	57	53
V\$TATA_C	8	16	4	12
V\$TANTIGEN_B	1	2	0	0
V\$TAL1_Q6	13	11	14	12
V\$STRA13_01	1	2	1	0
V\$STAT6_02	36	55	47	46
V\$STAT5A_04	142	157	150	143
V\$STAT5A_01	1	1	1	0
V\$STAT4_01	111	111	96	101
V\$STAT3_02	127	149	147	132
V\$STAT1_03	40	42	47	47
V\$STAT_Q6	0	1	3	1
V\$STAT_01	6	11	6	8
V\$SRY_02	2	1	0	0
V\$SRY_01	142	156	151	142
V\$SREBP1_Q6	117	126	127	123
V\$SREBP1_02	4	4	4	1
V\$SREBP1_01	2	2	3	0
V\$SREBP_Q3	0	3	2	1
V\$SP1_Q6_01	54	40	58	63
V\$SP1_Q6	2	3	5	7
V\$SP1_Q4_01	1	1	2	5
V\$SP1_Q2_01	55	61	59	62
V\$SP1_01	21	25	17	26
V\$SOX9_B1	0	0	1	0
V\$SOX5_01	20	23	19	17
V\$SOX17_01	141	157	143	139
V\$SMAD3_Q6	18	26	25	17
V\$SMAD_Q6_01	0	0	0	2
V\$SMAD_Q6	42	41	39	35
V\$SF1_Q6	73	75	86	82
V\$S8_01		1	0	0
V\$SRFX_Q6	10	13	20	25
V\$PU1_Q6	92	97	95	94
V\$POU6F1_01	2	1	0	0
V\$POU3F2_02	1	5	2	2
V\$POU1F1_Q6	13	17	7	3
V\$PITX2_Q2	30	44	36	35
V\$PEA3_Q6	141	155	146	138
V\$PBX1_03	5	4	5	5
V\$PBX1_01	10	6	8	8
V\$PBX_Q3	0	1	0	0
V\$PAX6_Q2	0	0	1	0
V\$PAX4_03	1	1	2	1
V\$PAX4_02	0	1	0	0
V\$PAX2_02	38	35	37	36

9.2 Häufigkeitsverteilung der predicted Transkriptionsfaktor-Bindestellen

predicted transcription factor binding sites	AUFREGULIERT	ABREGULIERT	unreguliert ABSENT	unreguliert PRESENT
V\$PAX_Q6	1	0	1	0
V\$PADS_C	10	16	14	16
V\$P53_DECA-MER_Q2	0	2	3	2
V\$P53_Q2	3	7	5	0
V\$OSF2_Q6	45	45	39	43
V\$OCT1_Q6	0	0	1	0
V\$OCT1_Q5_01	6	4	6	2
V\$OCT1_B	12	15	14	9
V\$OCT1_Q7	2	1	2	2
V\$OCT1_Q6	1	0	0	0
V\$OCT_Q6	6	4	6	2
V\$NRF2_Q4	0	0	0	1
V\$NRF2_Q1	1	2	4	2
V\$NRF1_Q6	2	6	8	8
V\$NKX62_Q2	3	5	6	1
V\$NKX3A_Q1	1	3	2	0
V\$NKX25_Q2	23	22	18	28
V\$NKX25_Q1	129	137	126	128
V\$NKX22_Q1	2	4	6	1
V\$NFY_Q6_01	0	0	1	1
V\$NFY_Q6	1	0	1	0
V\$NFY_C	0	0	0	1
V\$NFY_Q1	2	0	1	0
V\$NFMUE1_Q6	7	3	11	0
V\$NFKB_Q6_01	1	1	0	0
V\$NFKB_Q6	2	3	1	0
V\$NFKB_C	1	0	0	0
V\$NFKAPPAB-65_01	4	10	4	2
V\$NFKAPPAB-50_01	5	3	1	1
V\$NFKAPPAB_Q1	4	10	4	2
V\$NFE2_Q1	2	0	0	6
V\$NFAT_Q6	8	5	7	7
V\$NFAT_Q4_01	2	3	3	6
V\$MZF1_Q2	1	0	0	0
V\$MZF1_Q1	57	72	78	70
V\$MYO-GENIN_Q6	112	111	127	114
V\$MYOD_Q6	8	5	9	2
V\$MYOD_Q1	1	1	1	2
V\$MYC_MAX_B	2	0	2	4
V\$MYC_Q2	83	83	98	83
V\$MYB_Q6	3	1	3	3
V\$MYB_Q5_01	72	90	80	74
V\$MYB_Q3	5	7	9	0
V\$MSX1_Q1	19	23	23	10
V\$MEIS1_Q1	0	2	2	1
V\$MEF2_Q6_01	2	2	3	1
V\$MEF2_Q6	50	54	43	35
V\$MAZ_Q6	110	131	131	115
V\$MAF_Q6_01	1	0	0	3
V\$LYF1_Q1	26	41	32	32
V\$LPOLYA_B	32	37	43	45
V\$LMO2COM_Q2	16	25	26	20
V\$LMO2COM_Q1	2	1	1	2
V\$LHX3_Q1	12	12	6	6
V\$LFA1_Q6	41	49	59	50
V\$LEF1_TCF1_Q4	1	2	0	3
V\$LEF1_Q6	4	2	13	7
V\$LEF1_Q2	146	157	158	147
V\$LBP1_Q6	123	124	130	126
V\$KROX_Q6	7	6	8	2
V\$IRF1_Q6	115	125	103	108
V\$IRF_Q6_01	5	5	2	3
V\$IPF1_Q4	0	1	1	1

9 Anhang

predicted transcription factor binding sites	AUFREGULIERT	ABREGULIERT	unreguliert ABSENT	unreguliert PRESENT
V\$IK3_01	0	1	0	0
V\$ICSBP_Q6	1	1	1	0
V\$HSF2_01	3	1	1	1
V\$HSF1_01	1	1	0	0
V\$HP1SITE-FACTOR_Q6	0	0	0	1
V\$HOXA4_Q2	48	46	33	42
V\$HOXA3_01	14	9	16	9
V\$HNF6_Q6	2	0	0	0
V\$HNF4_DR1_Q3	0	2	0	0
V\$HNF3B_01	0	0	0	1
V\$HNF3-ALPHA_Q6	45	49	49	45
V\$HMX1_01	2	2	1	1
V\$HMG1Y_Q6	113	117	109	103
V\$HLF_01	2	0	1	0
V\$HFH3_01	1	0	1	0
V\$HFH1_01	2	0	2	0
V\$HELIOSA_02	2	9	3	0
V\$HEB_Q6	48	51	66	58
V\$GEN_INI3_B	43	52	63	35
V\$GEN_INI2_B	89	101	97	75
V\$GEN_IN1_B	43	52	63	35
V\$GATA6_01	18	19	6	22
V\$GATA4_Q3	2	0	1	1
V\$GATA3_03	4	4	2	6
V\$GATA3_02	2	4	5	5
V\$GATA3_01	24	18	16	25
V\$GATA2_03	2	4	5	5
V\$GATA2_02	2	4	5	5
V\$GATA2_01	1	1	4	1
V\$GATA1_06	1	2	0	3
V\$GATA1_05	7	2	7	3
V\$GATA1_04	1	0	0	0
V\$GATA1_02	1	0	0	2
V\$GATA1_01	3	4	2	6
V\$GATA_Q6	94	99	89	96
V\$GATA_C	0	2	3	3
V\$FREAC4_01	0	0	1	0
V\$FOXO4_01	3	2	1	1
V\$FOXO1_01	46	36	36	38
V\$FOXM1_01	86	88	81	90
V\$FOXD3_01	2	0	1	2
V\$EVI1_06	10	22	12	10
V\$EVI1_05	0	1	0	0
V\$EVI1_03	0	1	0	0
V\$EVI1_02	0	2	1	1
V\$ETS2_B	0	0	1	0
V\$ETS_Q6	53	57	61	53
V\$ETS_Q4	0	4	3	5
V\$ETF_Q6	104	133	110	121
V\$EN1_01	68	61	56	57
V\$ELK1_02	0	0	1	0
V\$ELF1_Q6	2	1	2	1
V\$EGR3_01	0	0	1	0
V\$EGR_Q6	6	0	5	3
V\$EBOX_Q6	9	6	15	7
V\$EBF_Q6	0	4	2	1
V\$E4F1_Q6	0	1	1	1
V\$E2F4DP2_01	22	25	20	21
V\$E2F4DP1_01	9	5	7	0
V\$E2F1DP2_01	22	25	20	21
V\$E2F1DP1RB_01	20	15	20	10
V\$E2F1DP1_01	22	25	20	21
V\$E2F1_Q6_01	1	0	1	0
V\$E2F1_Q6	9	5	7	4
V\$E2F1_Q4_01	4	1	3	0

9.2 Häufigkeitsverteilung der predicted Transkriptionsfaktor-Bindestellen

predicted transcription factor binding sites	AUFREGULIERT	ABREGULIERT	unreguliert ABSENT	unreguliert PRESENT
V\$E2F1_Q4	14	16	14	23
V\$E2F1_Q3	9	5	7	4
V\$E2F_Q6	9	5	7	4
V\$E2F_Q4	9	5	7	4
V\$E2F_Q3_01	4	1	3	0
V\$E2F_Q3	9	5	7	4
V\$E2F_Q2	133	148	136	144
V\$E2F_02	20	15	20	10
V\$E2A_Q6	101	96	123	108
V\$E2A_Q2	28	27	28	30
V\$E12_Q6	0	1	1	1
V\$DTYPEPA_B	2	0	0	1
V\$DELTAEF1_01	1	1	2	0
V\$DBP_Q6	88	103	89	100
V\$CREL_01	7	8	11	12
V\$CREBP1-CJUN_01	22	30	26	19
V\$CREBP1_Q2	0	0	1	0
V\$CREBP1_01	5	7	4	0
V\$CREBATF_Q6	10	18	14	4
V\$CREB_Q4_01	1	1	2	1
V\$CREB_Q4	0	0	1	0
V\$CREB_Q3	83	94	79	81
V\$CREB_Q2	0	1	0	1
V\$CREB_02	0	0	0	1
V\$CREB_01	18	23	18	13
V\$CP2_01	7	5	3	5
V\$COREBINDING-FACTOR_Q6	61	66	53	39
V\$CIZ_01	11	10	12	10
V\$CHCH_01	130	154	144	141
V\$CETS1P54_01	0	0	0	1
V\$CETS1P54_02	8	6	6	8
V\$CETS168_Q6	74	68	88	72
V\$CEBP-GAMMA_Q6	0	1	1	0
V\$CEBPA_01	0	0	1	0
V\$CEBP_Q3	1	4	3	0
V\$CEBP_Q2_01	0	0	0	0
V\$CEBP_01	0	0	1	0
V\$CDXA_02	126	150	123	118
V\$CDXA_01	101	118	94	84
V\$CDX2_Q5	1	0	0	0
V\$CAP_01	89	99	90	79
V\$CACBINDING-PROTEIN_Q6	42	35	48	32
V\$CAAT_01	3	2	6	3
V\$BARBIE_01	0	0	0	1
V\$BACH2_01	0	0	1	0
V\$ATF6_01	14	11	14	15
V\$ATF1_Q6	0	2	1	1
V\$ATF_B	1	1	2	0
V\$ATATA_B	1	1	2	1
V\$AREB6_04	86	98	89	77
V\$AREB6_03	0	0	3	0
V\$AREB6_01	1	0	0	0
V\$AP4_Q6_01	34	28	47	33
V\$AP4_Q6	4	7	10	0
V\$AP4_Q5	3	1	3	4
V\$AP3_Q6	43	55	38	35
V\$AP2REP_01	115	117	135	109
V\$AP2-GAMMA_01	23	19	20	26
V\$AP2-ALPHA_01	54	60	69	74
V\$AP2_Q6_01	3	1	1	1
V\$AP2_Q6	4	1	3	0

predicted transcription factor binding sites	AUFREGULIERT	ABREGULIERT	unreguliert ABSENT	unreguliert PRESENT
V\$AP1FJ_Q2	1	0	2	1
V\$AP1_Q6_01	30	38	29	27
V\$AP1_Q6	5	5	7	6
V\$AP1_Q4_01	31	38	29	27
V\$AP1_Q4	2	1	3	2
V\$AP1_Q2_01	17	12	13	15
V\$AP1_Q2	4	0	2	4
V\$AP1_C	8	10	14	9
V\$AP1_01	0	0	1	0
V\$AML1_Q6	148	160	156	149
V\$AML1_01	148	160	156	149
V\$ALPHACP1_01	1	4	1	4
V\$AHRHIF_Q6	5	5	2	2
V\$AHR_Q5	1	2	2	2
V\$AFP1_Q6	0	1	0	1
V\$ACAAT_B	18	13	13	7

Die Auflistungen der jeweiligen PTFs zugehörig den einzelnen IRA-regulierten Genen und nicht regulierten Kontroll-Genen finden sich auf dem zu dieser Arbeit gehörenden Datenträger.

9.3 Funktionelles Clustering auf Basis der Gene Ontology-Klassifizierungen

Die vollständigen Daten des *Gene Ontology*-Clusterings für alle annotierten IRA-regulierten Gene der verwendeten Microarrays finden sich auf dem zu dieser Arbeit gehörenden Datenträger.

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, Oktober 2009

Christian Calles