

**Logische Modellierung
der DNA-Schadens-Antwort
in humanen Epithelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologe Rainer Poltz
geb. am 22.02.1977 in Hannover

Gutachter: Prof. Dr. Michael Naumann
Prof. Dr. Stefan Bornholdt

eingereicht am: 28.08.2012

verteidigt am: 21.02.2013

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle Innere Medizin der Otto-von-Guericke-Universität (OvGU) Magdeburg durchgeführt und finanziell durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, das Forschungszentrum Dynamische Systeme der OvGU und ein Stipendium der Medizinische Fakultät der OvGU gefördert.

Prof. Dr. Michael Naumann danke ich sehr für die Möglichkeit zur Durchführung der Doktorarbeit in seinem Institut, seine Unterstützung und die Bewilligung zahlreicher Konferenzbesuche.

Dr. Steffen Klamt und seiner Mitarbeiterin Regina Samaga (MPI für Dynamik Komplexer Technischer Systeme) danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei der Modellierung und die zahlreichen wertvollen Ratschläge zur Problemlösung. Dr. Raimo Franke (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) bin ich für die intensive Unterstützung bei der Einarbeitung in die logische Modellierung und die zahlreichen Tipps dankbar.

Dankbar bin ich auch Dr. Aurélien Naldi und Prof. Dr. Denis Thieffry (TAGC Inserm, Université de la Méditerranée, Marseille, Frankreich), die mir immer mit Rat zur Seite standen, wenn es ein Problem mit den dynamischen Modellierungen gab.

Dr. Jörg Schaber (Institut für Experimentelle Innere Medizin) und Dr. Thilo Beyer (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der OvGU) haben mich mit vielen Ratschlägen unterstützt und mir so manchen komplizierten Sachverhalt erläutert. Ebenso bin ich Dr. Ute Haus (Institut für Mathematische Optimierung der OvGU) für seine Erläuterungen mathematischer Hintergründe der logischen Modellierungen dankbar.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben auch Prof. Dr. Michael B. Yaffe (Center for Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA) und Prof. Dr. Shigeki Miyamoto (McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin-Madison, Madison, USA) beigetragen, mit denen ich stimulierende Diskussionen führen konnte und die mir so manche Frage zur DNA-Schadens-Antwort beantwortet haben.

Auch allen noch nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Innere Medizin danke ich ausdrücklich, da sie mich auf vielfältige Weise unterstützt und motiviert haben.

Besonders danke ich auch meinen Eltern und Geschwistern sowie Dr. Nadja Kerstin, Dr. Fabian Heitzeberg, Marc Borgmann, dem Kater Mungo und meinen weiteren Freunden für die intensive Unterstützung und Begleitung während dieser Doktorarbeit.

Nicht zuletzt danke ich den Gutachtern dieser Arbeit für die Durchsicht und Bewertung dieser Dissertation.

1. Einleitung	5
1.1 Die DNA-Schadens-Antwort	5
1.2 Die DNA-Schadens-Antwort in der Tumorthherapie	10
1.3 Die Rolle der DNA-Schadens-Antwort in menschlichen Erkrankungen	13
1.4 Signaltransduktionsnetzwerke und ihre Modellierung	14
1.5 Modellierungsmethoden und ihre Anwendungen	17
2. Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Computerprogramme	23
3.1.2 Datenbanken	23
3.2 Methoden	23
3.2.1 Datenauswahl	23
3.2.2 Interaktionsgraph und diskretes logisches Modell	25
3.2.3 Strukturelle Analysen	30
3.2.4 Dynamische Analysen	33
3.2.5 Netzwerkreduktion	36
3.2.6 Validierung des Modells	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Logisches Modell der DNA-Schadens-Antwort	38
4.2 Validierung des Modells	41
4.3 Funktionelle Abhängigkeiten im Netzwerk	44
4.4 Dynamik der DNA-Schadens-Antwort	46
4.5 Potentielle Zielproteine zur Sensibilisierung von Karzinomen	51
4.6 Simulationen der DNA-Schadens-Antwort bei Erbkrankheiten	53
4.7 Molekulare Defekte, die potentiell zur Karzinogenese beitragen	56
5. Diskussion	58
5.1 Regulation der DNA-Schadens-Antwort und ihre Dynamik	58
5.2 Identifizierung potentieller therapeutischer Zielproteine und die Rolle von Biomarkern	62
5.3 Erkrankungen, die mit Defekten in der DNA-Schadens-Antwort einhergehen	65
5.4 Schlussfolgerungen	67

Inhaltsverzeichnis	
6.A Zusammenfassung	68
6.B Summary	69
7. Abkürzungen und Symbole	70
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	73
9. Literaturverzeichnis	74
10. Anhang	95
11. Wissenschaftliche Publikationen	104
12. Erklärung	105

1. Einleitung

1.1 Die DNA-Schadens-Antwort

Schäden der DNA sind von hoher biomedizinischer Bedeutung. Pro Tag und Zelle entstehen ca. 100.000 DNA-Schäden (Hoeijmakers 2009). Sie werden durch Umweltfaktoren, wie ionisierende oder ultraviolette Strahlung (Khanna et al 2001), aber auch durch zelleigene Faktoren, wie etwa Reaktive Sauerstoffspezies, Replikationsfehler oder einige Onkogene* ausgelöst (de Bont et al 2004, Bartek et al 2007). Schädigungen der DNA blockieren lebenswichtige Funktionen, wie Replikation und Transkription, und darüber hinaus können sie Mutationen und chromosomale Instabilität bewirken. Dies wiederum kann zur Karzinogenese (Tumorentwicklung) führen. Diesen Gefährdungen begegnen eukaryotische Zellen mit der Aktivierung einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen, die zusammenfassend als DNA-Schadens-Antwort bezeichnet werden (Abb. 1.1) (Ciccia und Elledge 2010). Diese beginnt mit der Detektion von DNA-Schäden durch Sensorproteine, welche die Signale an ein komplexes Signaltransduktionsnetzwerk weiterleiten, in dem die Integration der Informationen erfolgt, gefolgt von einer adäquaten zellulären Reaktion. Diese besteht im Wesentlichen aus einer Arretierung des Zellzyklus an so genannten Zellzyklus-Kontrollpunkten (Shimada et al 2006), gefolgt von DNA-Reparatur oder zellulärer Seneszenz (permanentem Zellzyklus-Arrest) (d'Adda di Fagagna 2008), oder aber die irreparabel geschädigte Zelle wird durch Apoptose (programmierten Zelltod) eliminiert (Cann et al 2007).

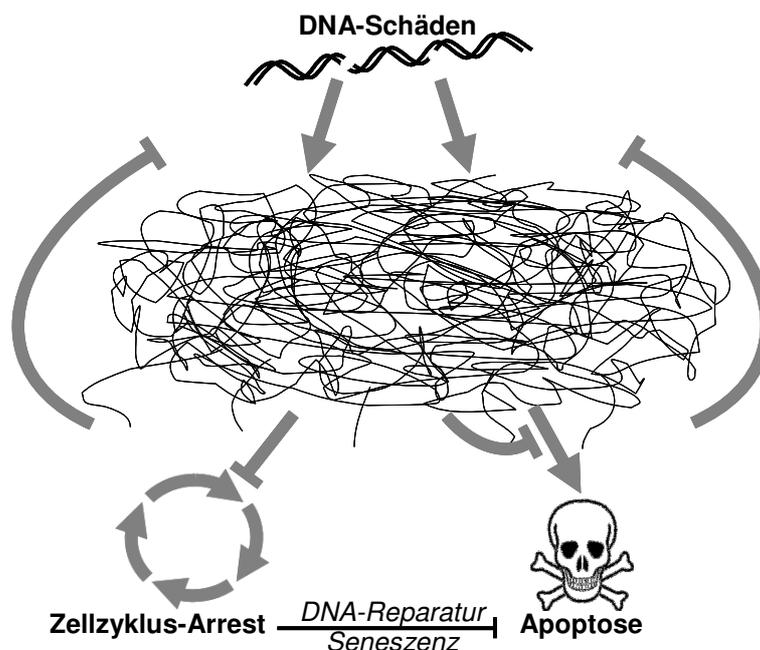


Abb. 1.1 Schema der DNA-Schadens-Antwort. Sensorproteine erkennen DNA-Schäden und leiten Signale über ein komplexes Signaltransduktionsnetzwerk weiter. Die Verarbeitung der Informationen führt zum Eintritt der Zelle in einen temporären Zellzyklus-Arrest, gefolgt von der Reparatur der DNA, oder zur Apoptose. Negative Feedbacks reprimieren einige Signalwege der DNA-Schadens-Antwort. Alternativ kann die Zelle in die Seneszenz eintreten, einen Zustand permanenten Zellzyklus-Arrests. Oftmals geht der Apoptose ebenfalls ein temporärer Zellzyklus-Arrest voraus.

* Ein Onkogen ist ein mutiertes oder überexprimiertes Gen, das die Karzinogenese fördert.

Einleitung

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) werden beispielsweise durch ionisierende Strahlung (insbesondere Röntgen- und Gammastrahlung) ausgelöst und gehören zu den gefährlichsten DNA-Schädigungen, da sie nur schwer repariert werden können (Khanna und Jackson 2001). Sie werden vom Proteinkomplex aus Meiotic recombination 11 (Mre11), Radiation 50 (Rad50) und Nijmegen breakage syndrome 1 (Nbs1) (MRN-Komplex) detektiert, der schließlich die Autophosphorylierung der Kinase Ataxia telangiectasia mutated (ATM) fördert. Demgegenüber führen DNA-Einzelstrangbrüche (SSBs, abgekürzt für engl. *single strand breaks*) oder Blockaden der DNA-Replikation zur Aktivierung und Rekrutierung von Replication protein A (RPA) und der Kinase Ataxia telangiectasia and rad3-related protein (ATR). Sowohl ATM als auch ATR phosphorylieren schließlich eine Vielzahl von Proteinen. Während Checkpoint kinase 2 (Chk2) vornehmlich von ATM phosphoryliert wird, phosphoryliert ATR bevorzugt Checkpoint kinase 1 (Chk1). Diese Checkpoint-Kinasen phosphorylieren schließlich Phosphatasen aus der Familie der Cell division cycle 25 homologs (Cdc25), was deren Inaktivierung bewirkt, die teilweise über ihre Ubiquitylierung und den Abbau (die Proteolyse) im 26S-Proteasom erfolgt. Das führt zum Zellzyklus-Arrest, da diese Phosphatasen für die Aktivierung der für den Zellzyklus essentiellen Cyclin-dependent kinases (Cdk) erforderlich sind. Je nach inaktivierter Cdc25 erfolgt der Zellzyklus-Arrest zwischen der Gap1 (G1)- und der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus (G1/S-Kontrollpunkt), innerhalb der S-Phase (Intra-S-Kontrollpunkt, oder zwischen der Gap2 (G2)- und der Mitose (M)-Phase (G2/M-Kontrollpunkt) (Harper und Elledge 2007, Ciccina und Elledge 2010). Ebenfalls eine wichtige Bedeutung für den Zellzyklus-Arrest kommt der Hemmung der Expression von Cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc) durch die microRNA 34c (miR-34c) zu, was den Intra-S-Kontrollpunkt aktiviert (Cannell et al 2010). Weitere von ATM und ATR abhängige Signalwege führen zur Aktivierung von Protein 53 (p53). Dieser Tumor-Suppressor* spielt eine Schlüsselrolle in der Entscheidung zwischen dem Überleben und der Apoptose der Zelle in Reaktion auf DNA-Schäden. Nach seiner Phosphorylierung löst er in Reaktion auf geringe DNA-Schäden vorwiegend über die Aktivierung der Expression des Cdk-Inhibitors Protein 21 (p21) Zellzyklus-Arrest aus (Vousden und Prives 2009).

Durch den Arrest des Zellzyklus gewinnt die geschädigte Zelle Zeit, je nach Art und Ausmaß der DNA-Schäden geeignete Reparaturmechanismen umzusetzen. Dabei werden spezifische Reparaturproteine zu den DNA-Schäden rekrutiert und durch posttranslationale Modifikationen aktiviert. SSBs werden etwa durch Basen-Exzisions-Reparatur beseitigt, während DSBs vorwiegend entweder durch Nichthomologe Endverknüpfung oder Homologe Rekombination beseitigt werden (Ciccina und Elledge 2010). Andere Reparaturmechanismen eliminieren etwa chemische Modifikationen der DNA (z. B. durch UV-Strahlung induzierte Pyrimidin-Dimere) (Ciccina und Elledge 2010), die außerhalb des Fokus dieser Arbeit stehen.

* Ein Tumor-Suppressor ist ein Protein, das der Karzinogenese entgegenwirkt.

Einleitung

Nach erfolgter Reparatur der DNA werden viele Signalwege zum Zellzyklus-Arrest durch negative Feedbacks und Phosphatasen deaktiviert, so dass die Zellen nun erneut proliferieren* (Clémenson und Marsolier-Kergoat 2009, Freeman und Monteiro 2010).

Während DNA-Schädigungen, die ein gewisses Ausmaß nicht überschreiten, meist repariert werden, können umfangreichere DNA-Schäden zur Apoptose führen (Ciccia und Elledge 2010). Auch im letzteren Fall sind die meisten beteiligten Signalwege ATM- bzw. ATR-abhängig. Eine wichtige regulatorische Rolle in der Induktion von Apoptose spielt Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2). Diese Kinase wird in der ungestörten Zelle durch die Ubiquitin-Ligase Murine double minute 2 (MDM2) ubiquitinyliert und schließlich degradiert. Nach schwerwiegender Schädigung der DNA wird MDM2 jedoch seinerseits nahezu vollständig degradiert, so dass HIPK2 nun stabil ist, und p53 an Serin 46 phosphoryliert; diese Phosphorylierung regt p53 zur Expression pro-apoptotischer Proteine an (Rinaldo et al 2007, Jiang et al 2010). Hierzu gehören Procaspase-6 sowie die zur B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-Familie gehörenden Proteine Bcl-2-associated X protein (Bax), BH3 interacting domain death agonist (Bid), p53-upregulated modulator of apoptosis (Puma) und Noxa (lateinisch für „Schaden“) (Schmitt et al 2007, Jiang et al 2010). Diese pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine erhöhen die Durchlässigkeit der äußeren Membran der Mitochondrien. Diese Erhöhung der Permeabilität der Membran erfolgt etwa durch die Bildung autonomer Kanäle. Zudem veranlassen die Bcl-2-Proteine ein Platzen der äußeren Mitochondrienmembran. Beide Prozesse führen zur Freisetzung von Molekülen des mitochondrialen Intermembranraums, unter ihnen Pro-Caspasen und die Caspase-aktivierenden Proteine Cytochrom c und Direct IAP binding protein with low pI (Diablo). Die anschließende kaskadenartige Proteolyse von Pro-Caspasen zu Caspasen führt über den irreversiblen Eintritt in die Apoptose schließlich zum Zelltod (Schmitt et al 2007, Bitomsky und Hofmann 2009). Neben dem beschriebenen Signalweg zur Einleitung der Apoptose transloziert p53 auch selbst ins Zytosol und aktiviert an der äußeren Mitochondrienmembran direkt die Bcl-2-Proteine Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak1) und Bax (Schmitt et al 2007). Neben der von p53 abhängigen Apoptose werden nach Exposition von Zellen mit DSBs-induzierenden Agenzien auch von p53 unabhängige Signalwege zur Apoptose aktiviert. Diese verlaufen beispielsweise über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Adenovirus E2 gene promoter region binding factor 1 (E2F-1) (Stevens et al 2003), über die Phosphorylierung von Promyelocytic leukemia (PML) an Serin 117 (Yang et al 2002) oder über die proteolytische Aktivierung von Caspase-2 (Kumar 2009), wobei allerdings nicht in allen Fällen eindeutig ist, ob diese Prozesse über die Induktion von DSBs verlaufen oder ob die betreffenden Agenzien diese Signalwege auf andere Weise - etwa über die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies - induzieren.

* Proliferation ist die fortlaufende Teilung einer Zelle.

Einleitung

2008). Zuvor an I κ B α gebundene NF- κ B-Dimere (vorrangig p50-p65) translozieren nun in den Nukleus, wo unter anderem nach Phosphorylierung durch IKK ϵ (Renner et al 2010) die Transkription von Zielgenen erfolgt (McCool und Miyamoto 2012). Obgleich das Spektrum der exprimierten Zielgene in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem DNA-schädigenden Stimulus variiert (Janssens und Tschopp 2006, Kasowski et al 2010), werden in der Regel Gene exprimiert, die für anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, wie etwa B-cell lymphoma-extra large (Bcl- x_L) und Bcl-2-related protein A1 (A1) kodieren (Karin und Lin 2002). Diese Proteine hemmen den oben beschriebenen Weg der von Mitochondrien abhängigen Apoptose. Entsprechend reprimiert überexprimiertes A1 die Apoptose nach ihrer Induktion durch das DSBs-induzierende Agens Etoposid (VePesid[®], VP16). Dabei hemmt A1 die im Verlauf der Apoptose stattfindende Depolarisierung der äußeren Mitochondrienmembran, die Freisetzung von Cytochrom c und die Aktivierung von Caspase-9 (Wang et al 1999). Auf molekularer Ebene könnte das Widerspiel zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen durch deren Heterodimerisierung* erklärt werden, wobei sich die Aktivitäten pro- und antiapoptotischer Bindungspartner neutralisieren würden. Demnach würde das Konzentrationsverhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen die Sensibilität der Zelle gegenüber apoptotischen Stimuli maßgeblich beeinflussen (Schmitt et al 2007).

Ein weiterer Zustand, den eine eukaryotische Zelle in der DNA-Schadens-Antwort einnehmen kann, ist die zelluläre Seneszenz, ein irreversibler Zellzyklus-Arrest, der durch eine dauerhaft aktive DNA-Schadens-Antwort initiiert und aufrechterhalten wird. Wie die Apoptose schützt auch dieser Zustand geschädigter Zellen vor neoplastischer Transformation (Ciccia und Elledge 2010). Bei der zellulären Seneszenz handelt es sich nicht - wie oft behauptet - um einen ausdifferenzierten Zustand, da sie nicht dem Endzustand eines zellulären Differenzierungsprogramms entspricht (d'Adda di Fagagna 2008). Noch ist unklar, welche Faktoren darüber entscheiden, ob die geschädigte Zelle durch Apoptose eliminiert wird oder in Seneszenz eintritt, jedoch könnten Art und Ausmaß der DNA-Schädigung sowie der Zelltyp hierbei eine Rolle spielen. Möglicherweise wird Seneszenz durch irreparable, für den Organismus potentiell gefährliche DNA-Schäden ausgelöst (Campisi und d'Adda di Fagagna 2007). Charakteristische morphologische Merkmale seneszenten Zellen sind neben hochgradig kondensiertem Chromatin (Ogrunc und d'Adda di Fagagna 2011) die SDFs (engl. *senescent-associated DNA-damage foci*), permante Konglomerate aus Signalproteinen der DNA-Schadens-Antwort (d'Adda di Fagagna 2008). Außerdem sind seneszente Zellen hochgradig sekretorisch aktiv, wobei sie eine Vielzahl an Matrix-Metalloproteinasen und Zytokinen (z. B. Interleukin-6) sekretieren; diese Erscheinung wird als Seneszenz-Assoziierter Sekretorischer Phänotyp bezeichnet. Einige der sekretierten Zytokine halten den seneszenten Zustand aufrecht, indem sie durch Bindung an ihre Oberflächenrezeptoren in denselben und in benachbarten Zellen Seneszenz-assoziierte

* Heterodimerisierung bezeichnet in der Biochemie die Bildung eines Komplexes aus zwei verschiedenen Molekülen.

Signaltransduktionswege dauerhaft aktivieren (autoparakrine Signaltransduktion). Zudem regen einige dieser Zytokine Immunzellen zur Eliminierung seneszenten Zellen an (Ogrunc und d'Adda di Fagagna 2011). Eine wichtige Rolle in der Expression vieler inflammatorischer Zytokine in seneszenten Zellen spielt wiederum NF- κ B (Vaughan und Jat 2011).

1.2 Die DNA-Schadens-Antwort in der Tumorthherapie

Die hohe zytotoxische Wirkung von DSBs und SSBs macht man sich in Therapien mit dem Ziel zunutze, Tumorzellen durch Apoptose zu eliminieren. Das beruht auf dem Umstand, dass Krebszellen schneller proliferieren und zumeist Defekte in der DNA-Schadens-Antwort aufweisen (Jackson und Bartek 2009). So gehören der Einsatz ionisierender Strahlung und die Verabreichung von Topoisomerase-Inhibitoren vom Typ der Topoisomerase-Gifte zu den häufigsten Maßnahmen der Tumorbekämpfung (Jackson und Bartek 2009).

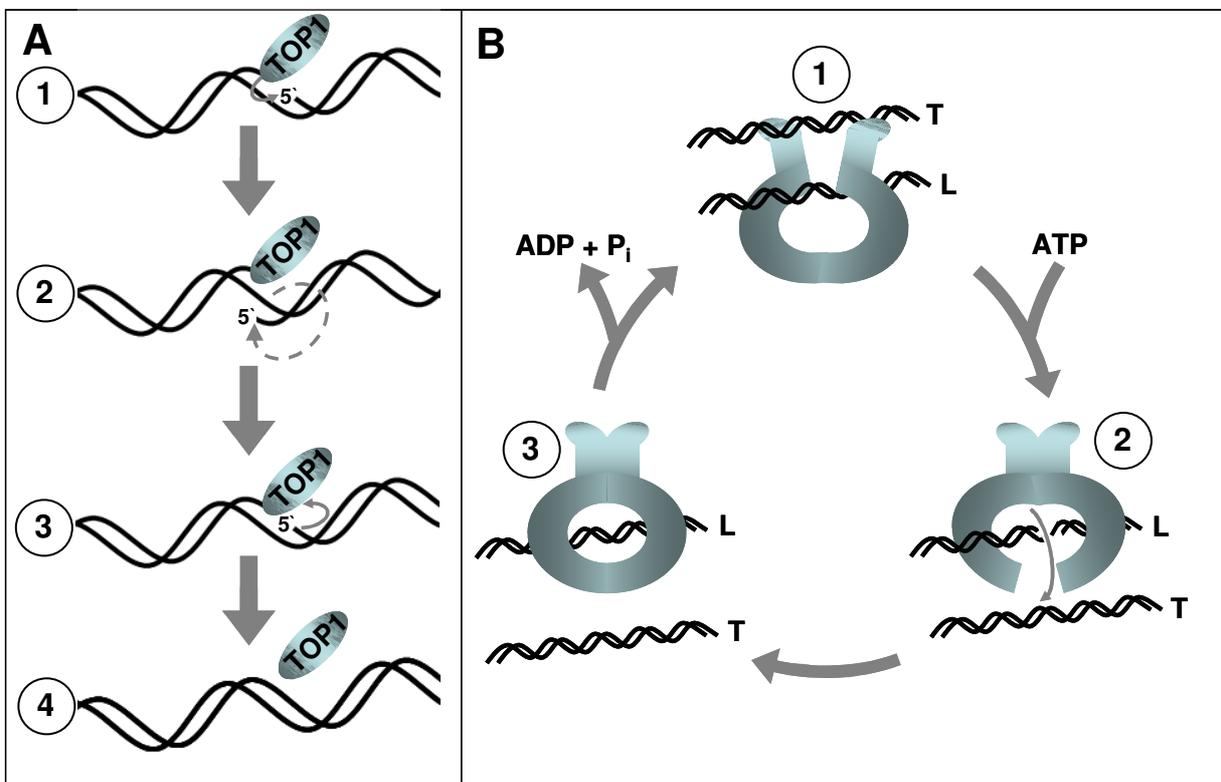


Abb. 1.3 Katalyse durch Topoisomerasen. A) Topoisomerasen vom Typ I binden an überdrehte (superspiralisierte) DNA unter Spaltung des Phosphodiesterückgrads eines DNA-Strangs in einer Transesterifizierungsreaktion. Die Topoisomerase ist im so gebildeten Spaltkomplex an das 3'-Ende* der DNA gebunden (1). Unter Abnahme der Superspiralisierung rotiert der gebrochene DNA-Strang nun um den intakten Komplementärstrang (2). Anschließend katalysiert die Topoisomerase I die Religation des DNA-Strangs (3) und setzt die DNA-Doppelhelix mit nun verminderter Superspiralisierung frei (4). B) Topoisomerasen vom Typ II sind Homodimere (Proteine aus zwei identischen Untereinheiten). In der offenen Konformation umschließen sie zwei doppelsträngige DNA-Segmente, die als Transfer (T)- bzw. Lücken (L)-Segment bezeichnet werden (1). Nach Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) geht die Topoisomerase in die geschlossene Konformation über und spaltet in einer Transesterifizierungsreaktion beide Stränge des L-Segments. Durch den gebildeten DSB führt der Spaltkomplex das intakte T-Segment, das durch Öffnen des Enzyms freigesetzt wird (2). Das L-Segment wird nun religiert (3). Infolge der Hydrolyse von ATP setzt die Topoisomerase schließlich auch das L-Segment frei, womit der Beginn eines neuerlichen Katalysezyklus ermöglicht wird (1). Im Verlauf der Katalyse durch Topoisomerasen vom Typ II kann die Superspiralisierung der DNA zu- oder abnehmen.

* Man unterscheidet zwischen dem 3'- und dem 5'-Ende eines DNA-Strangs. Ersteres ist durch eine Hydroxylgruppe, letzteres durch eine Phosphorylgruppe gekennzeichnet, die an das 3'- bzw. das 5'-Kohlenstoffatom der Deoxyribose des jeweiligen terminalen Deoxyribonukleotids gebunden ist.

Einleitung

Ionisierende Strahlung schädigt DNA überwiegend durch Erzeugung von DSBs (Ward 1988). Dies gilt auch für Typ-II-Topoisomerase-Gifte (Deweese und Osheroff 2009). Topoisomerasen katalysieren die Änderungen der topologischen Eigenschaften der DNA, d. h. alle Vorgänge, die den Bruch und die Religation (Wiederverschließung) eines DNA-Strangs erfordern. Diese Enzyme sind daher sowohl für die Remodellierung des Chromatins als auch für alle Vorgänge des DNA-Metabolismus (Stoffwechsels), wie Rekombination, Reparatur, Replikation und Transkription essentiell, da die dazu erforderliche Entwindung und Wiederverpackung der DNA stets mit Änderungen ihrer topologischen Eigenschaften (Grad der Verdrillung der DNA) einhergehen. Je nachdem, ob die Topoisomerasen im Verlauf der Katalyse SSBs oder DSBs erzeugen, werden diese Enzyme als Topoisomerasen vom Typ I (TOP1) respektive Typ II (TOP2) klassifiziert (Champoux 2001, Wang 2002). Topoisomerasen vom Typ I (Abb. 1.3A) brechen in einer Transesterifizierungsreaktion einen DNA-Strang einer DNA-Doppelhelix. Dabei binden sie den gebrochenen Strang am freiwerdenden 3'-Ende. Nach Bildung dieses kovalenten Spaltkomplexes rotiert das freie 5'-Ende des gebrochenen Strangs unter Abnahme der Superspiralisierung um den intakten Strang. Abschließend katalysiert die TOP1 die Religation der DNA (Pommier 2006). Typ-I-Topoisomerase-Gifte (z. B. Camptothecin) stabilisieren den Spaltkomplex durch nichtkovalente Bindung an ihr aktives Zentrum, wodurch die Religation der DNA gehemmt wird. Im Ergebnis bleibt ein SSB zurück, der endgültig nicht mehr von der TOP1 verschlossen werden kann, sobald die DNA-Doppelhelix dort im Zuge der Transkription oder Replikation entwunden wird. Dieser SSB löst bereits eine DNA-Schadens-Antwort aus (Pommier 2006, Schmitt et al 2007). Wie bei SSBs allgemein der Fall, kann im Verlauf der Replikation der DNA durch Synthese des Komplementärstrangs eines gebrochenen Strangs aus einem SSB ein DSB erzeugt werden (Abb. 1.4) (Pommier 2006); daher können SSBs auch zu einer DSBs-Antwort führen (Strumberg et al 2000, Jackson und Bartek 2009). Topoisomerasen vom Typ II (Abb. 1.3B) binden zwei DNA-Doppelhelices, brechen daraufhin einen der Doppelstränge ebenfalls in einer Transesterifizierungsreaktion (Bildung des Spaltkomplexes), führen den intakten Doppelstrang durch den DSB und religieren die Stränge schließlich wieder, wobei der Grad der Superspiralisierung der DNA nun verändert ist. Analog zu den Typ-I-Topoisomerase-Giften stabilisieren auch die Typ-II-Topoisomerase-Gifte (z. B. VP16) den Spaltkomplex, in diesem Fall allerdings durch kovalente Bindung an ihr aktives Zentrum. Auch hier wird die Religation der DNA gehemmt, so dass ein DSB zurückbleibt (Deweese und Osheroff 2009). Oftmals ist die zytotoxische Wirkung DNA-schädigender Agenzien, und damit die Effektivität von Chemo- und Radiotherapien, durch die Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten sowie

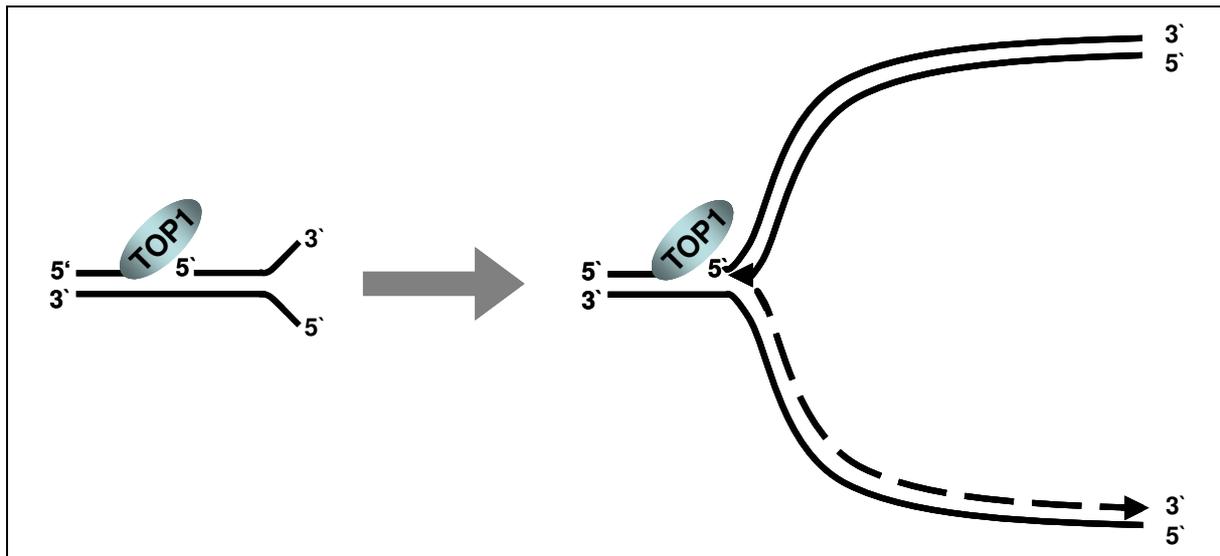


Abb. 1.4 Umwandlung von SSBs in DSBs. SSBs, die beispielsweise im Verlauf der Katalyse durch eine Topoisomerase 1 entstehen, werden bei der Replikation in DSBs umgewandelt, wenn der gebrochene Strang durch Synthese des Leitstrangs dupliziert wird.

des meist anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B in Tumorzellen vermindert (Zhou und Bartek 2004, Orlowski et al 2002). Strategien zur Chemo- und Radiosensibilisierung von Tumorzellen zielen darauf ab, diese zellulären Überlebensmechanismen zu blockieren, um eine höhere therapeutische Effektivität zu erreichen (Kostanová-Poliaková und Sabová 2005, Nakanishi und Toi 2005, Lord und Ashworth 2012). Auch die Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen kann Tumorzellen für DNA-schädigende Therapien sensibilisieren (Helleday et al 2008). Eine effiziente Strategie zur selektiven Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Therapien ist die Ausnutzung von häufigen Mutationen in Tumorzellen. Inhibitionen, die nur gemeinsam mit aktivierten Onkogenen oder inaktivierten Tumor-Suppressoren letal wirken, töten bevorzugt Tumorzellen ab. In normalen (nicht entarteten) Zellen, in denen diese Onkogene nicht aktiviert bzw. Tumor-Suppressoren nicht inaktiviert sind, sind die zytotoxischen Wirkungen dieser Inhibitionen schwächer (Reinhardt et al 2009). So haben Jiang et al 2009 mit einem systembiologischen Ansatz Enzyme gefunden, deren Inhibition nur auf Zellen ohne funktionellen Tumor-Suppressor p53 letal wirkt, wenn die betreffenden Zellen mit dem TOP2-Inhibitor Doxorubicin behandelt werden. Vielfach beruht ein letales Zusammenwirken von Tumor-spezifischen Mutationen und den untersuchten Inhibitionen in Zellen mit DNA-Schäden auf einer gezielten Reprimierung des Zellzyklus-Arrests. Die betroffenen Zellen können sich dann trotz massiv geschädigter DNA fortlaufend teilen, was zu ihrem Absterben durch mitotische Katastrophe führt. Darunter versteht man eine Form des Zelltods, die mit einer Bildung von ungewöhnlich großen Zellen mit mehreren Zellkernen in der Mitose einhergeht (Portugal et al 2010). Die so identifizierten Proteine sind daher potentiell geeignete Ziele zur Chemo- und Radiosensibilisierung von p53-defizienten Tumoren (Jiang et al 2009).

1.3 Die Rolle der DNA-Schadens-Antwort in menschlichen Erkrankungen

In der Entstehung von Krebs spielt die DNA-Schadens-Antwort eine wichtige Rolle, da Tumorzellen häufig ein erhöhtes Maß an DNA-Schäden aufweisen (Lord und Ashworth 2012). Eine intakte DNA-Schadens-Antwort bietet einen gewissen Schutz vor Tumorgenese, da geschädigte Zellen in einem frühen Stadium der Karzinogenese durch Apoptose abgetötet werden können oder ihre Proliferation durch Seneszenz dauerhaft gestoppt werden kann (Bartek et al 2007). Entsprechend tragen Defekte, die zum Ausfall von Apoptose oder zur Umgehung von Zellzyklus-Arrest oder DNA-Reparatur führen, bedeutend zur Karzinogenese bei. Daher weisen Tumorzellen häufig Defekte in der DNA-Schadens-Antwort auf. Selektive Vorteile durch unkontrollierte Proliferation ergeben sich für die Zelle, solange die DNA-Schäden ein tolerierbares Ausmaß nicht übersteigen. Lediglich nach schwerwiegenden DNA-Schädigungen, die etwa durch Tumorthérapien ausgelöst werden, können die genannten Defekte hingegen zum Zelltod infolge mitotischer Katastrophe führen (Sherr 2004, Ciccio und Elledge 2010). Dieser Fall entspricht jedoch nicht dem ungestörten Zustand von Zellen. Entsprechend führen etwa Mutationen von ATM oder dessen Interaktionspartnern Chk2, Nbs1 und Rad50 zu einer Verdoppelung des Risikos, an Brustkrebs zu erkranken (Walsh und King 2007). Mutationen in den DNA-Reparatur-Genen Breast cancer 1, early onset (BRCA1) und Breast cancer 2, early onset (BRCA2) führen zu einer Disposition für erbliche Formen von Brustkrebs (Walsh und King 2007). Aufgrund der bedeutenden Rolle der DNA-Schadens-Antwort in der Krebsentstehung werden viele bekannte Tumor-Suppressoren durch dieses Signaltransduktionsnetzwerk aktiviert (Rai et al 2007). Zudem hemmt die DNA-Schadens-Antwort zahlreiche von Proto-Onkogenen* kodierte Proteine, wie etwa c-Myc (Cannell et al 2010) oder B-cell lymphoma 3 (Bcl-3) (Rocha et al 2003).

Auch einige Erbkrankheiten sind auf defekte Proteine der DNA-Schadens-Antwort zurückzuführen. So ist das Louis-Bar-Syndrom ein Chromosomenbruchsyndrom, das auf Mutationen des für ATM kodierenden Gens zurückzuführen ist (Lavin 2008). Ähnliche Syndrome sind Ataxia telangiectasia-like disorder (Mre11 mutiert) (Lavin 2008), das Nijmegen-Breakage-Syndrom (Nbs1 mutiert) (Antoccia et al 2006), Nijmegen-Breakage-Syndrom-Like-Disorder (Rad50 mutiert) (Waltes et al 2009) und das ATR-Seckel-Syndrom (reduzierte Expression von ATR) (O'Driscoll et al 2004).

Trotz der biomedizinischen Bedeutung und der großen Mengen publizierter Daten über die DNA-Schadens-Antwort ist über die Integration der weitergeleiteten Informationen im Signaltransduktionsnetzwerk wenig bekannt. Ein ganzheitliches Bild der DNA-Schadens-Antwort könnte aber neue Möglichkeiten zum Verständnis genetischer Erkrankungen eröffnen und die gemeinsame Analyse einer großen Zahl an Interaktionen im

* Ein Proto-Onkogen ist ein Gen, das bei Überexpression oder in bestimmten mutierten Zuständen die Karzinogenese fördert.

Signaltransduktionsnetzwerk könnte die Identifizierung neuer therapeutischer Zielmoleküle ermöglichen.

1.4 Signaltransduktionsnetzwerke und ihre Modellierung

Signaltransduktionsnetzwerke bilden die Schnittstelle zwischen der zellulären Umgebung einerseits und dem Genom sowie dem Metabolismus der Zelle andererseits. Oftmals wird die Signaltransduktion durch Aktivierung von Rezeptorproteinen initiiert, welche die Informationen über vernetzte Signaltransduktionswege weiterleiten (Pawson 1995, Jordan et al 2000). Die Komplexität der Signalwege wird dabei über eine enorme Steigerung des Repertoires an Signalproteinen durch posttranslationale Modifikationen erhöht (Walsh et al 2005), wobei im Menschen allein Phosphorylierungen von über 500 Kinasen und ca. 150 Phosphatasen reguliert werden (Papin et al 2005). In den Signaltransduktionsnetzwerken können die Signale etwa durch Vernetzung und Gewichtung mehrerer Informationen verarbeitet werden (Jordan et al 2000).

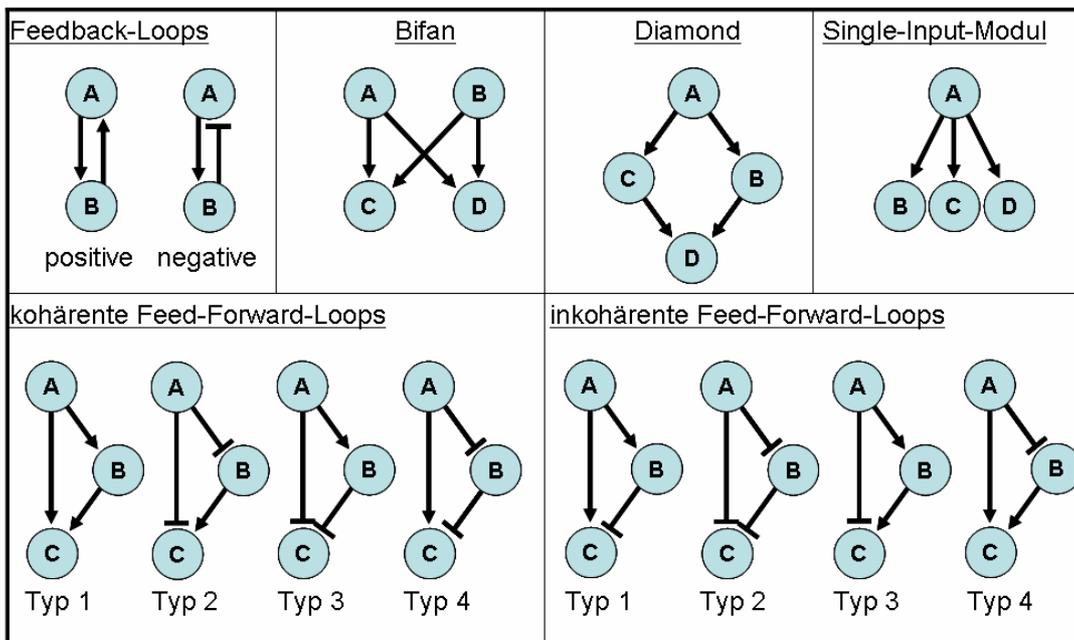


Abb. 1.5 Netzwerkmodule. Netzwerkmodule sind strukturelle Muster (Subgraphen), die häufiger in einem Netzwerkgraphen auftreten, als statistisch zu erwarten wäre, die also im Verlauf der Evolution des Netzwerks einer positiven Selektion unterlagen. Jedes Netzwerkmodul kann bestimmte dynamische Funktionen in der Signalverarbeitung im Netzwerk erfüllen. Ein positiver Feedback-Loop kann zwei alternative stabile Zustände des Netzwerks (Bistabilität) bewirken; so können z. B. zwei sich gegenseitig aktivierende Enzyme beide aktiv oder beide inaktiv sein. Positiver Feedback liegt auch vor, wenn zwei Komponenten sich gegenseitig inhibieren. Ein negativer Feedback-Loop ist eine notwendige Voraussetzung für Oszillationen (periodisch wechselnde Aktivitätszustände), da unter natürlichen Bedingungen nie alle Komponenten gleichzeitig denselben Aktivitätszustand einnehmen können. Bifan-Motive erlauben die Integration mehrerer Signale. Ähnliche Wirkungen haben Diamond-Motive, die aus zwei redundanten Signalwegen zusammengesetzt sind. Single-Input-Module ermöglichen einem Transkriptionsfaktor A die zeitlich geordnete Transaktivierung seiner Zielgene B, C und D. In Feed-Forward-Loops reguliert eine Komponente A eine andere Komponente C einerseits direkt, andererseits indirekt über eine weitere Komponente B. In kohärenten Feed-Forward-Loops hat die direkte Interaktion der Komponente A mit der Komponente C dasselbe Vorzeichen (aktivierend oder inhibierend) wie der indirekte Signalweg von A zu C über B. Demgegenüber sind inkohärente Feed-Forward-Loops durch unterschiedliche Vorzeichen der beiden Signalwege von A zu C charakterisiert. Kohärente wie inkohärente Feed-Forward-Loops werden je nach Vorzeichen der sie zusammensetzenden Interaktionen nochmals in verschiedene Typen unterteilt. Je nach Typ können Feed-Forward-Loops nur lang anhaltende „AN“- oder „AUS“-Signale weiterleiten oder Pulse in den weitergeleiteten Signalen generieren.

Einleitung

Eine wesentliche Rolle in der Signalverarbeitung und der Dynamik* der Signaltransduktion kommt den Netzwerkmotiven zu (Abb. 1.5). Dies sind strukturelle Motive, die in einem gegebenen Netzwerk signifikant häufiger vorkommen, als statistisch zu erwarten wäre, deren Anzahl sich im Netzwerk also infolge eines Selektionsdrucks erhöht hat. Die Bedeutung von Netzwerkmotiven liegt in den von ihren Strukturen abhängigen Funktionen, die sie in der Signalverarbeitung erfüllen können (Alon 2007a). Die einfachsten Netzwerk motive sind positive und negative Autoregulation (Selbstaktivierung bzw. Selbstinhibition). Ein häufiges Beispiel einer positiven Autoregulation ist die Aktivierung der Expression eines Transkriptionsfaktors durch sich selbst. Solch eine Regulation kann die Reaktionszeit, also die Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Konzentration eines Proteins, verlängern. Darüber hinaus kann dieses Netzwerkmotiv Bistabilität, also zwei alternative stabile Zustände bewirken, da die Konzentration des Proteins im stabilen Zustand entweder hoch oder niedrig sein kann. Demgegenüber kann negative Autoregulation die Reaktionszeit verkürzen und die Schwankungen der Konzentration des Proteins zwischen Zellen reduzieren. Neben der Rolle von Netzwerkmotiven in der Signalverarbeitung zeigen die Wirkungen von Feedback-Loops auf die Reaktionszeiten von Proteinen beispielhaft die Auswirkungen von Netzwerkmotiven auf die Dynamik von Signaltransduktionswegen (Alon 2007b). In vielen Fällen führen die verarbeiteten Signale schließlich zu Änderungen der Genexpression. Dadurch wird eine dem Stimulus angemessene koordinierte Reaktion, wie etwa die Proliferation der Zelle ausgelöst (Pawson 1995).

Die bekannten Signaltransduktionsnetzwerke sind in den letzten Jahrzehnten zunehmend komplexer geworden, da das biomedizinische Wissen stetig angewachsen ist, insbesondere im Zuge der Anwendung von Hochdurchsatz-Technologien (Dhingra et al 2005, Zhao und Grant 2011, Zhang et al 2011a). Damit einhergehend hat sich die Anzahl dokumentierter Fachartikel in der Datenbank *PubMed* des Zentrums für Biotechnologische Informationen (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*) der USA zwischen den Jahren 1986 und 2010 auf über 20 Millionen Einträge nahezu verdreifacht, wobei seit einigen Jahren ein exponentieller Anstieg zu verzeichnen ist (Lu 2011). Entsprechend wird es zunehmend schwieriger, das wachsende Wissen über Signaltransduktionsnetzwerke mental zu erfassen und zu analysieren (Eungdamrong und Iyengar 2004). Dies ist aber gerade für das Verständnis von Erkrankungen wie Diabetes oder Krebs wichtig, die mit veränderten Signaltransduktionswegen einhergehen (Finkel und Gutkind 2003). Daher wurden für diese Zwecke mathematische Methoden entwickelt bzw. anderen Wissenschaftsdisziplinen entlehnt (Aldridge et al 2006, Gilbert et al 2006, Breitling et al 2008, Kestler et al 2008).

Prinzipiell lassen sich zwei Vorgehensweisen zur Generierung biochemischer Netzwerkmodelle unterscheiden. Der „Bottom-Up“-Ansatz besteht aus einer Integration zahlreicher einzelner experimenteller Daten eines bereits bekannten Netzwerks in ein

* Die Dynamik eines Signaltransduktionsnetzwerks bezeichnet sein zeitliches Änderungsverhalten.

Einleitung

Modell. Dieser Ansatz erlaubt sehr detaillierte Prädiktionen, erfordert jedoch dementsprechend detaillierte Kenntnisse über die molekularen Prozesse im untersuchten System. Je unvollständiger das modellierte Netzwerk charakterisiert ist, desto weniger eignet sich der „Bottom-Up“-Ansatz, da die Wahrscheinlichkeit steigt, dass entscheidende Interaktionen im Modell fehlen, da sie bisher nicht entdeckt wurden. In einem solchen Fall noch zu entdeckender Interaktionen ist der „Top-Down“-Ansatz besser geeignet. Hierbei wird die Netzwerkstruktur aus globalen Beobachtungen der Zellen unter bestimmten Bedingungen abgeleitet, z. B. aus Microarray-Daten, die unter bestimmten Stimulationsbedingungen erhoben wurden. Aus diesen Datensätzen wird dabei durch Rekonstruktion der einzelnen Interaktionen zwischen den zahlreichen gemessenen Molekülen das Modell konstruiert (Stark et al 2003, Andrec et al 2005, van Riel 2006).

Eine wichtige Rolle bei der Erstellung eines Modells spielt seine zu wählende Größe. Je kleiner das Modell ist, desto geringer ist seine Aussagekraft. Je größer und entsprechend weniger detailliert das Modell hingegen ist, desto größer ist die mit den Prädiktionen behaftete Unsicherheit, da allfällige Unsicherheiten in experimentellen Daten mehr Annahmen erfordern. Die Wahl der geeigneten Größe und Detailfülle des Modells hängt von der bearbeiteten Fragestellung ab (Hlavacek et al 2006).

In jedem Fall geben mathematische Modelle die realen Netzwerke in abstrahierter Form wieder und sind wiederum je nach bearbeiteter Fragestellung entweder qualitativer oder quantitativer, diskreter oder kontinuierlicher sowie deterministischer oder stochastischer Natur. In deterministischen Modellen ist das Verhalten des Systems ausgehend von einem bekannten Zustand des Modells eindeutig vorhersagbar, d. h. nachfolgende Zustände des Systems sind durch den Ausgangszustand eindeutig bestimmt und hängen nicht von Zufallsprozessen ab. Demgegenüber beinhalten stochastische Modelle von Zufallsprozessen gesteuertes Verhalten, wobei nachfolgenden Zuständen nur Wahrscheinlichkeiten zugeordnet werden können. Demzufolge kann ein stochastisches System ausgehend von einem bekannten Zustand alternative Zustände einnehmen, wobei einige mit höherer Wahrscheinlichkeit eintreten, als andere (Allen und Linda 2010). Meist werden deterministische Ansätze gewählt, da stochastische Effekte beim Modellieren von Signaltransduktionsnetzwerken in vielen Fällen vernachlässigt werden können. Für einige Fragestellungen sind stochastische Effekte jedoch nicht vernachlässigbar klein, und können sogar Variationen des ausgebildeten Phänotyps einer Zelle verursachen, wie etwa im Falle stochastischer Fluktuationen im Verlauf der Genexpression (Ribeiro 2010). Hier können zufällige Schwankungen der - vergleichsweise niedrigen - Konzentration einer mRNA (Transkript) große Auswirkungen auf die - vergleichsweise hohe Anzahl - der in der Translation dieser mRNA synthetisierten Proteine haben (McAdams und Arkin 1997).

Einleitung

In Abhängigkeit von den genannten Eigenschaften der Modelle können schließlich in computergestützten (*in silico*) Analysen Beobachtungen reproduziert und experimentell überprüfbare Hypothesen generiert oder auf ihre Konsistenz hin überprüft werden, wobei der zeitliche und finanzielle Aufwand erheblich geringer ausfällt, als in Fällen rein experimenteller Studien.

1.5 Modellierungsmethoden und ihre Anwendungen

Gewöhnliche-Differentialgleichungs-Modelle

Meist werden zur Modellierung von Signaltransduktionsnetzwerken Gewöhnliche Differentialgleichungen (engl. *ordinary differential equations*, ODEs) in deterministischer, kontinuierlicher Form verwendet. Als einzige Variable tritt in diesen Gleichungen die Konzentration (meist von Proteinen) auf, deren Dynamik untersucht wird, d. h. die Konzentration wird nach der Zeit abgeleitet (Butcher 2003, Aldridge 2006). Das wird wie folgt in einer dynamischen Gleichung ausgedrückt:

$$dC/dt = \text{Syntheserate} - \text{Abbaurrate}$$

Diese Funktion besagt, dass die Änderung der Konzentration C eines Moleküls über die Zeit t sich aus der Differenz zwischen seiner Syntheserate und der Abbaurrate ergibt. Der Term auf der rechten Seite ist linear oder nichtlinear. Letzteres kann etwa in einer Michaelis-Menten-Kinetik begründet sein. Durch Kopplung von ODEs lässt sich das dynamische Verhalten zahlreicher Komponenten eines Netzwerks beschreiben. Eine zentrale Annahme bei dieser Methode ist, dass es sich bei dem untersuchten zellulären Kompartiment um ein chemisch homogenes System handelt, dass also keine räumlichen Konzentrationsgradienten vorliegen. Entsprechend der verbreiteten Anwendung biochemischer ODE-Modelle gibt es zahlreiche Softwarepakete zu ihrer numerischen Lösung, mit denen das Verhalten eines Systems unter verschiedenen Bedingungen simuliert werden kann, z. B. *GEPASI* (<http://www.gepasi.org/>) oder *POTTERS WHEEL* (<http://www.potterswheel.de/>). Derartige Modelle werden im Verlauf ihrer Analysen vielfach Sensitivitätsanalysen unterzogen, also Quantifizierungen der Veränderungen im Output (z. B. der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors) eines Modells als Folge von Veränderungen bestimmter Parameter, etwa des Ausmaßes der Phosphorylierung eines Rezeptors.

Mit einem ODE-Modell wurde die DNA-Reparatur durch Nichthomologe Endverknüpfung und die Abhängigkeit der Effizienz dieses Reparaturweges von der Reihenfolge der Rekrutierung daran beteiligter Proteine analysiert. Basierend auf dieser *In-silico*-Studie wurden Experimente zur weiteren Aufklärung der Sequenz der Rekrutierung von Reparaturproteinen vorgeschlagen (Li und Cucinotta 2011).

Einleitung

Mit einem anderen ODE-Modell der DNA-Schadens-Antwort wurde die Dosis-Wirkungs-Kurve hinsichtlich der Häufigkeit der Transformation von Zellen zu Tumorzellen (maligne Transformation) infolge der Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen ionisierender Strahlung vorhergesagt (Zhao und Ricci 2010).

In mehreren Studien wurden die Oszillationen* von p53 in Reaktion auf DNA-Schäden mithilfe von ODE-Modellen auf Basis von Messergebnissen aus Untersuchungen von Einzelzellen untersucht (Batchelor et al 2009). Die von p53 abhängige Expression von Wild-type p53-induced phosphatase (Wip1) und MDM2 vermittelt diese Oszillationen nach Exposition mit ionisierender Strahlung in einer Vielzahl von Zelllinien (Batchelor et al 2009). Während Wip1 für die Generierung der Oszillationen essentiell ist, steuert MDM2 ihre Feinregulierung. Dabei determiniert die Dauer der Oszillationen die Wirkung von p53 auf die Zelle: im Verlauf der Oszillationen wird p53 zunächst an Serin 15 oder Serin 20 phosphoryliert, und induziert Zellzyklus-Arrest; übersteigt die Dauer der Pulse einen Schwellenwert, dann wird p53 auch an Serin 46 phosphoryliert, und transaktiviert nun pro-apoptotische Gene. Auf diese Weise induziert p53 nur dann Apoptose, wenn die Schäden der DNA nicht innerhalb einer angemessenen Zeitspanne repariert werden können (Zhang et al 2011b).

Auch die Dynamik der Aktivität von NF- κ B bei Induktion mit Stimuli wie Tumor necrosis factor α (TNF- α) oder UV-Strahlung wurde mithilfe von ODE-Modellen analysiert (Cheong et al 2008). Mit einem solchen Modell wurde gezeigt, dass UVC-Strahlung die Aktivität von NF- κ B über die Inhibition der Translation von freien I κ B-Proteinen erhöht, wobei eine von UVC-Strahlung unabhängige konstitutive Aktivität des IKK-Komplexes (des Komplexes aus IKK α , IKK β und NEMO) Voraussetzung für diese gesteigerte Aktivierung von NF- κ B ist. Die Prädiktionen wurden in Mäuse-Embryo-Fibroblastenzellen experimentell bestätigt (O'Dea et al 2008). Das Modell enthält 24 regulatorische Komponenten (Moleküle, wie Proteine, RNAs, etc.), wobei identische Proteine in verschiedenen Kompartimenten durch verschiedene Komponenten repräsentiert werden. Letzteres ist eine gängige Methode zur Erweiterung von ODE-Modellen, um intrazelluläre Transportprozesse in die Modelle einzubeziehen (Eungdamrong und Iyengar 2004).

Bayessche Netzwerke

Ein Beispiel für einen stochastischen „Top-Down“-Ansatz zur Modellierung von Signaltransduktionsnetzwerken stellt die Anwendung Bayesscher Netzwerke (benannt nach Thomas Bayes) dar (Pearl 1985, Pe'er 2005). Ein Bayessches Netzwerk wird durch einen gerichteten azyklischen Graphen repräsentiert. Als Graph wird dabei eine Menge an Knoten bezeichnet, die durch Pfeile (gerichtete Kanten) verbunden sind. Dieser Graph darf im Falle klassischer Bayesscher Netzwerke keine Zyklen (wie Feedback-Loops) enthalten, und ist

* Oszillationen bezeichnen in der vorliegenden Arbeit alternierende Aktivitätszustände bzw. Konzentrationen von Biomolekülen.

Einleitung

daher azyklisch. Jeder Knoten repräsentiert eine Zufallsvariable, die den Aktivitätszustand eines Proteins oder anderen Signalmoleküls wiedergibt. Pfeile verbinden paarweise Knoten und repräsentieren Interaktionen zwischen den zugehörigen Signalmolekülen. Wenn ein Pfeil von Knoten A zu Knoten B verläuft, dann wird A als Elternknoten von B bezeichnet. Für jede Zufallsvariable ist eine bedingte (konditionale) Wahrscheinlichkeitsverteilung definiert. Diese gibt an, wie sich die Wahrscheinlichkeiten auf die Werte der Zufallsvariablen, also die Aktivitätszustände des betreffenden Signalmoleküls, verteilen. Anschaulich ausgedrückt besteht eine bedingte Abhängigkeit der Aktivität eines Rezeptors von der Aktivität seines Liganden (bindenden Moleküls). Entsprechend ist jede Variable, sofern ihre Elternknoten gegeben sind, von allen anderen Variablen unabhängig (Markov-Annahme). Bayessche Netzwerke sind äquivalent, wenn sie in ihren bedingten Unabhängigkeiten übereinstimmen, da sie in diesem Fall nicht durch Messungen von Variablen (z. B. Erhebung von Proteomdaten) unterscheidbar sind. Dieser wahrscheinlichkeitstheoretische Formalismus eignet sich insbesondere zur Modellierung von Netzwerken, wenn die zugrunde liegenden Hochdurchsatz-Daten ein starkes Rauschen aufweisen oder lückenhaft sind. Ein Nachteil ist allerdings die im Vergleich zur Netzwerkgröße erforderliche hohe Rechenleistung. Die Bayessche Inferenz (Ableitung) der Netzwerke aus Datensätzen beruht auf dem Bayestheorem zur Berechnung bedingter Wahrscheinlichkeiten, wobei die am besten zu den experimentellen Daten passenden Modelle identifiziert werden. Dabei ist es möglich, statistische Informationen über nicht gemessene Variable zu erhalten (Pe'er 2005, Klipp et al 2005, Wilkinson 2007). So wurde aus Durchfluss-Zytometrie-Daten ein Signaltransduktionsnetzwerk in aktivierten T-Zellen abgeleitet, wobei neben bereits bekannten auch bislang unbekannte Interaktionen gefunden wurden (Sachs et al 2005, Koch et al 2009).

Diskrete logische Netzwerke

Quantitative Modellierungen von Signaltransduktionsnetzwerken sind aufgrund der erforderlichen Kenntnis kinetischer Parameter einerseits und des hohen Rechenaufwands andererseits in der Regel auf kleine Systeme beschränkt. Hingegen erlauben qualitative Modelle die Analyse größerer Netzwerke und werden der Tatsache gerecht, dass verfügbare Daten über Signaltransduktionswege überwiegend qualitativer Natur sind. Diskrete logische Netzwerke (Thomas et al 1995, Chaouiya et al 2003, Albert und Wang 2009) lassen sich zum einen als gerichtete Graphen, d. h. als eine Menge von Knoten (regulatorische Komponenten), die durch Pfeile (gerichtete Interaktionen) verbunden sind, repräsentieren. Der Aktivitätszustand jeder regulatorischen Komponente wird durch eine logische Zustandsvariable beschrieben. Im einfachsten (Booleschen) Fall gibt es nur zwei diskrete Aktivitätszustände („AN“ oder „AUS“). Solch eine Modellierung eines Signalmoleküls als

Einleitung

binärer Schalter ist zwar eine Vereinfachung, gibt aber in vielen Fällen die realen Verhältnisse in hinreichender Näherung wieder. Zum anderen kann das Modell durch eine Liste logischer Funktionen definiert werden. Diese spezifizieren mithilfe Boolescher Operatoren den Aktivitätszustand jeder Komponente in Abhängigkeit von den Aktivitätszuständen ihrer Regulatoren. Die Berechnung der Dynamik diskreter logischer Modelle geschieht in diskreten Schritten durch die Aktualisierung der Werte der Zustandsvariablen entsprechend den zugehörigen logischen Funktionen. So werden nachfolgende Zustände des gesamten Netzwerks sukzessiv ermittelt. Diese Zustände lassen sich mit einem Zustandsübergangsgraphen illustrieren, der somit das dynamische Verhalten des Netzwerks darstellt; jeder Knoten dieses Graphen repräsentiert einen Zustand des Netzwerks zu einem gegebenen Zeitpunkt, also die Aktivitätszustände aller regulatorischen Komponenten zu diesem Zeitpunkt. Die gerichteten Kanten des Zustandsübergangsgraphen repräsentieren mögliche Zustandsübergänge des Netzwerks. Da der Zustandsraum diskreter logischer Modelle endlich ist, erreicht das System letztendlich einen Attraktor, also einen Zustand bzw. eine Reihe von Zuständen, die das Netzwerk nicht mehr verlassen kann. Attraktoren werden in Punktattraktoren (logische stationäre Zustände), wie der Zellzyklus-Arrest, und in zyklische Attraktoren (Zyklen von Zuständen, wie der Zellyklus) klassifiziert. Im Zustandsübergangsgraphen ist ein Punktattraktor durch einen terminalen Knoten am Ende einer Folge von Zustandsübergängen gegeben, während ein zyklischer Attraktor durch einen terminalen Zyklus repräsentiert ist.

Logische Netzwerke wurden seit ihrer erstmaligen Anwendung auf biochemische Netzwerke im Jahr 1969 (Kauffman 1969) vielfach erfolgreich zur Modellierung biologischer regulatorischer Netzwerke eingesetzt (Albert und Wang 2009, Bornholdt 2008, Morris et al 2010). So wurde mit einem diskreten logischen Modell der von SSBs und DSBs ausgelösten Signaltransduktion der Abbau von MDM2, die Aktivierung der Expression von MDM2 durch p53, die gegenseitige Inhibition von p53 und MDM2 sowie die Reparatur der DNA wiedergegeben. Damit wurden die Auswirkungen von verschiedenen hohen (i) Abbauraten von MDM2, (ii) transkriptionellen Aktivitäten von p53 und (iii) DNA-Schäden auf das dynamische Verhalten von p53 untersucht. Den Ergebnissen zufolge können Variationen von Parameterwerten - die etwa durch Mutationen ausgelöst werden – zu lediglich vier qualitativ verschiedenen Szenarien des dynamischen Verhaltens des Netzwerks führen. Diese Resultate liefern Erklärungen für vorangegangene Literaturangaben (Abou-Jaoudé et al 2009). Mit einem weiteren Booleschen Modell wurde die durch Fas ligand (FasL) in Hepatozyten induzierte Signaltransduktion modelliert. Die Autoren untersuchten das Zusammenwirken dieses Signalwegs mit weiteren pro-apoptotischen Signalwegen. Dabei wurden vier logische stationäre Zustände des Netzwerks identifiziert, von denen jeweils zwei mit dem Überleben bzw. der Apoptose der betreffenden Zelle einhergehen. Zudem konnten

Einleitung

durch Infektion mit Cytomegaloviren ausgelöste Perturbationen des Netzwerks reproduziert werden (Philippi et al 2009). Auch die Sequenz der Zellzyklusphasen der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* wurde mit einem Booleschen Modell korrekt wiedergegeben. Ein Vergleich mit dem Zellzyklus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* enthüllte Unterschiede in der Dynamik zwischen beiden Zellzyklen (Davidich und Bornholdt 2008). Die Differenzierung von T-Helferzellen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulationsbedingungen konnte ebenfalls mit einem logischen Formalismus simuliert werden (Naldi et al 2010). Auch die von Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) induzierte Signaltransduktion in Hepatozyten (Leberzellen) wurde mithilfe logischer Modelle untersucht. Dabei wurden strukturelle Eigenschaften dieser Netzwerke untersucht und funktionelle Abhängigkeiten zwischen Signalproteinen entdeckt (Ryll et al 2011). Logische Modelle eignen sich zudem zur Identifizierung therapeutischer Zielmoleküle. So wurde Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) als ein potentiell Zielprotein zur Repression der Aktivierung von Extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in der durch die Rezeptor-Tyrosinkinase Cellular mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) vermittelten Signaltransduktion nach Infektion mit dem pathogenen Magenbakterium *Helicobacter pylori* vorhergesagt und experimentell verifiziert (Franke et al 2008). Mit einem anderen Literatur-basierten Booleschen Signaltransduktionsmodell wurde c-Myc als ein mögliches therapeutisches Zielprotein zur Behandlung von Brustkrebs identifiziert (Sahin et al 2009).

2. Zielsetzung der Arbeit

Mit der systembiologischen Arbeit wurde das Ziel verfolgt, ein tieferes Verständnis der Dynamik der DNA-Schadens-Antwort sowie der Regulation der zentralen Transkriptionsfaktoren p53 und NF- κ B in menschlichen Epithelzellen zu erlangen. Ein weiteres wichtiges Ziel war die Identifizierung möglicher Zielproteine zur Chemo- und Radiosensibilisierung von Karzinomen. Darüber hinaus war beabsichtigt, die Auswirkungen einiger Erbkrankheiten auf die DNA-Schadens-Antwort zu untersuchen und molekulare Defekte zu definieren, die potentiell zur Karzinogenese beitragen.

Um die Allgemeinverständlichkeit der Arbeit zu fördern, wurde auf Formeln und formale Definitionen so weit wie möglich verzichtet.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Computerprogramme

Für strukturelle und dynamische Analysen wurden folgende Computerprogramme benutzt:

- *CellDesigner 4.2* (Funahashi et al 2003)
- *MATLAB*-Programmpaket *CellNetAnalyzer V. 7.0* (Klamt et al 2007) zusammen mit *MATLAB R2008b* (The MathWorks, Natick, MA, USA)
- JAVA-Tool *GINsim 2.4 alpha* (Naldi et al 2009, Chaouiya et al 2012)
- JAVA-Tool *MAVisto V 2.7.0* (Schreiber und Schwöbbermeyer 2005, Schwöbbermeyer und Wünschiers 2012)

3.1.2 Datenbanken

- *American Type Culture Collection*: <http://www.lgcstandards-atcc.org>
- *LOCATE subcellular localization database*: <http://locate.imb.uq.edu.au>
- *The Tumor Gene Family of Databases*: <http://www.tumor-gene.org/tgdf.html>
- *Protein Knowledgebase (UniProtKB)*: <http://www.uniprot.org/uniprot>

3.2 Methoden

3.2.1 Datenauswahl

In der Doktorarbeit wurde ein diskretes logisches Modell der Signaltransduktion der DNA-Schadens-Antwort in menschlichen Epithelzellen erstellt. Dazu wurden der Literatur Angaben über kausale Beziehungen (Interaktionen) zwischen Signalkomponenten entnommen, die auf menschliche Epithelzelllinien im Sinne der *American Type Culture Collection* oder *ex-vivo*-Epithelzellen übertragbar sind. Mit der Beschränkung auf menschliche Epithelzellen wurde das Ziel verfolgt, einerseits nur Informationen aus ähnlichen Systemen zu integrieren, aber andererseits die Auswahl an Daten nicht durch allzu stringente Kriterien einzuschränken. Alle ausgewählten Daten entsprechen definierten Qualitätskriterien (Tabelle 3.1). Zudem ist die Übertragbarkeit aller Befunde auf Bedingungen im genotoxischen Stress durch DNA-Strangbrüche belegt. Informationen über die intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen wurden der Datenbank *LOCATE* entnommen, sofern die analysierten Publikationen nicht diese Angaben enthielten.

Tab. 3.1 Qualitätskriterien zur Aufnahme von Daten in das Modell

Experiment im genotoxischen Stress	Akzeptiert zum Nachweis von...
Immunoblot (mit Ladekontrolle)	Proteinen und posttranslationalen Modifizierungen
Northernblot (mit Ladekontrolle)	RNA (qualitativer Nachweis)
Microarray-Analyse	RNA (quantitativer Nachweis)
Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion mit anschließendem Southernblot (mit Ladekontrolle)	RNA (quantitativer Nachweis)
Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Anwesenheit eines Biomoleküls und dessen Quantifizierung
Knockdown mit siRNAs mit anschließendem Nachweis des Knockdowns im Northern / Western Blot	Reduktion der Konzentration eines Proteins zur Untersuchung von dessen Funktionen
Ektopische Expression eines Gens nach Knockout des endogenen Gens (Komplementation)	funktionellen Eigenschaften des kodierten Proteins
Behandlung von Zellen mit spezifischem Inhibitor	funktionellen Eigenschaften des inhibierten Enzyms
Funktionsverlust-Mutationen in endogenen Genen (Punktmutationen oder Deletionen)	funktionellen Eigenschaften des Genprodukts
Co-Immünpräzipitation	physikalischer Interaktion
Co-Elution von Proteinen unterschiedlicher Größe in Size-Exclusion-Chromatographie	physikalischer Interaktion
Elektromobilityshift-Assay mit Ladekontrolle	Protein/DNA-Interaktionen
Chromatin-Immünpräzipitation und anschließende spezifische Amplifizierung von DNA-Sequenzen mit Polymerasekettenreaktion	Bindung eines Transkriptionsfaktors an <i>cis</i> -regulatorische DNA-Sequenzen
Inkubation eines Substrats mit einem endogenen Enzym nach dessen Pulldown oder Immünpräzipitation aus dem Zell-Lysat (<i>In-vitro</i> -Kinase-/ <i>In-vitro</i> -Phosphatase-Assay)	enzymatischer Aktivität des untersuchten Proteins in Bezug auf das untersuchte Substrat unter den gegebenen Bedingungen; zusätzlich muss ein Effekt <i>in vivo</i> gezeigt worden sein
Überexpression	Abhängigkeiten von bestimmten Aminosäuren (z. B. Überexpression von mutierten Proteinen zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen; zusätzlich muss eine Rolle des endogenen Proteins gezeigt worden sein)
Reportergen-Assay	transkriptionelle Aktivität von Transkriptionsfaktoren
Fluoreszenzmikroskopie	intrazellulärer Lokalisierung
Zellkern-Zytosol-Separation mit anschließendem Westernblot mit nukleären und zytosolischen Markerproteinen als Nachweis der Trennung von Lysaten des Zellkerns und des Zytosols	intrazellulärer Lokalisierung (im Zellkern oder im Zytosol)
Comet-Assay	DNA-Strangbrüchen
Statistische Korrelation zwischen Anwesenheit eines Transkriptionsfaktors und Expression eines Gens	Zielgenen eines Transkriptionsfaktors; da derartige Korrelationen oftmals Zelllinien-spezifisch sind, muss solch eine Korrelation in mehr als einer Epithelzelllinie gezeigt worden sein
Behandlung mit Topoisomerase-Inhibitoren, Ionisierender Strahlung (Röntgen-, Gammastrahlung), radiomimetischem Agens Neocarzinostatin oder Replikationsinhibitor Hydroxyurea (HU)	Erzeugung von DSBs bzw. SSBs, die in DSBs konvertiert werden
Durchflusszytometrie	Zellzyklusphasen
Colony-Survival-Assay	Überlebensrate von Zellen

3.2.2 Interaktionsgraph und diskretes logisches Modell

Grundlage einiger Analysen war die Darstellung der dem untersuchten Netzwerk zugrunde liegenden Struktur als gerichteter Graph (Interaktionsgraph) (Klamt et al 2006, Fauré und Thieffry 2009). Dieser besteht aus einer Menge von Knoten, die regulatorische Komponenten (z. B. Proteine, Ionen) symbolisieren. Die Knoten sind durch eine Menge von gerichteten Kanten zur Darstellung regulatorischer Beziehungen verbunden. Dabei handelt es sich entweder um Aktivierungen, die durch Pfeile dargestellt werden, oder um Inhibitionen, symbolisiert durch T-förmige Kanten. Die Richtungen der Kanten geben die Richtungen der Signalübertragung in den dargestellten Signaltransduktionswegen wieder. Jedem Knoten ist eine diskrete logische Zustandsvariable zugeordnet, die den Aktivitätszustand der betreffenden Komponente wiedergibt. Im hier behandelten Modell handelt es sich zumeist um binäre (Boolesche, also zweiwertige) Variable mit den Werten ,0' (inaktiv) oder ,1' (aktiv), nur im Falle der regulatorischen Komponenten ATM-P (-P = Phosphorylgruppe), IKK-complex-P und I κ B α können die (dreiwertigen) Variable zusätzlich den Wert ,2' (hoch aktiv) annehmen. Tatsächlich lassen sich Aktivitäten von Signalmolekülen vielfach angenähert als diskrete Zustände auffassen, da in Zellen enzymatische Reaktionen und Komplexbildungen oftmals einer sigmoidalen (s-förmigen) Reaktionskinetik folgen (Huang 2001). Ein klassisches Beispiel für eine sigmoidale Kinetik ist die Bindung eines Sauerstoffmoleküls an Hämoglobin, was die Bindung weiterer Sauerstoffmoleküle erleichtert (kooperative Bindung) (Neet 1995). Diese sigmoidale Kinetik lässt sich durch eine Hill-Funktion beschreiben. Das wesentliche Verhalten einer derartigen Kinetik besteht in einem annähernd Schalter-artigen Wechsel der Aktivität einer regulierten Komponente Y zwischen zwei Zuständen, wenn der Aktivitätszustand der regulierenden Komponente X einen Schwellenwert überschreitet. Je steiler diese Reaktionskurve verläuft, desto weiter nähert sie sich einer logischen Stufenfunktion zur Beschreibung molekularer ,AN'/,AUS'-Schalter (Abb. 3.1) an. Jedoch lassen sich einige Reaktionen nicht mit binären Stufenfunktionen beschreiben, da die regulierten Komponenten entweder mehrere Aktivitätszustände einnehmen - wie im Falle von ATM-P, IKK-complex-P und I κ B α im vorliegenden Modell - oder keine Schalter-artige Aktivitätszustände einnehmen. Die Aktivitäten der regulierten Komponenten lassen sich aber auch im letzteren Fall oftmals mit mehrwertigen diskreten Variablen approximativ darstellen (Morris et al 2010).

Das diskrete logische Modell ist durch eine Liste logischer Funktionen zur Darstellung regulatorischer Beziehungen zwischen regulatorischen Komponenten repräsentiert (Thomas et al 1991, Albert und Wang 2009). Jede logische Funktion definiert eine hinreichende Bedingung für die Aktivität einer regulatorischen Komponente. So stellt die Funktion ,nuclear p50-p65-P \rightarrow SENP2' die Aktivierung der Expression von Sentrin/Sumo-specific protease2 (SENP2) durch das im Nukleus phosphorylierte NF- κ B-Dimer p50-p65 dar.

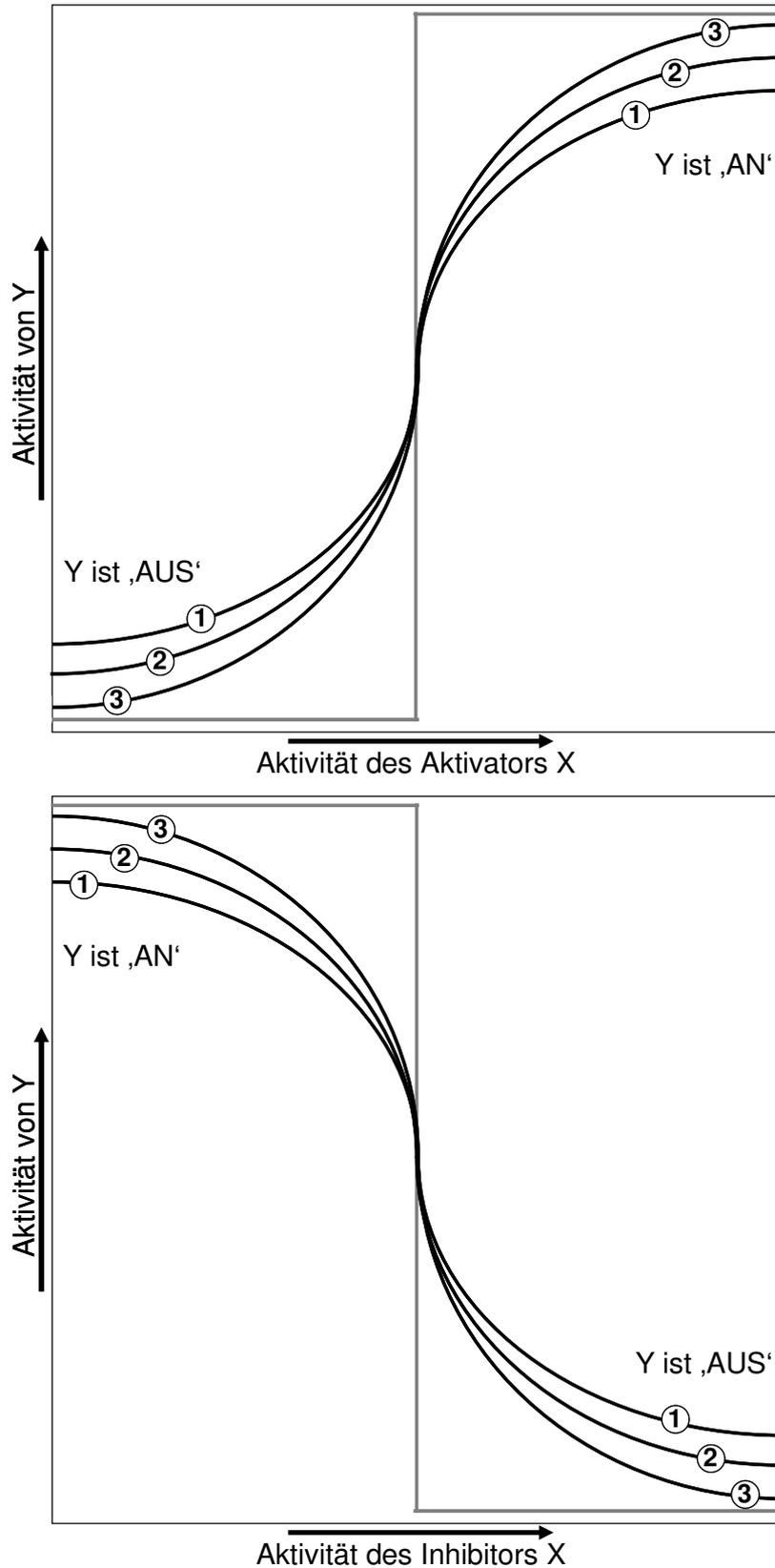


Abb. 3.1 Binäre Stufenfunktion als Näherung der Hill-Funktion. Viele molekulare Interaktionen lassen sich mit einer Hill-Funktion beschreiben. Binäre logische Funktionen sind als Stufenfunktionen (grau) Näherungen von Hill-Funktionen, wobei der Schwellenwert der Aktivierung (oberes Diagramm) bzw. Inhibition (unteres Diagramm) von Y durch X dem Aktivierungskoeffizienten der Hill-Funktion entspricht und am Wendepunkt der Kurve liegt. Je größer der (für die Kurven 1, 2 und 3 ansteigende) Hillkoeffizient, desto steiler der Verlauf der Kurve und desto höher daher der Grad ihrer Näherung an die logische Stufenfunktion. Die regulierte Komponente Y verhält sich somit im idealisierten Fall wie ein Schalter mit den alternativen Zuständen ‚AN‘ (‚1‘) und ‚AUS‘ (‚0‘).

Dieses Beispiel zeigt zudem, dass Interaktionen im Modell nicht notwendigerweise direkter Art sind. Tatsächlich beinhaltet das Beispiel die Aktivierung der Transkriptions- und Translationsmaschinerie. Diese Prozesse und die daran beteiligten Komponenten wurden jedoch der Einfachheit halber nicht ins Modell integriert, da sie stets in die Genexpression involviert und daher nicht für den genotoxischen Stress spezifisch sind.

Im hier vorgestellten Modell wurden logische Funktionen in der disjunktiven Normalform formuliert. Mit dieser Notation lassen sich alle logischen Operationen mittels ausschließlicher Implementierung der Booleschen Operatoren UND, ODER und NICHT definieren (Mendelson 1970). Der Operator UND wird durch ein ‚ \cdot ‘ symbolisiert und steht für eine Konjunktion im Sinne von „sowohl A als auch B “. In der disjunktiven Normalform werden Interaktionen als UND-Verknüpfungen von Zustandsvariablen ausgedrückt. Die so gebildeten Konjunktionsterme* können ihrerseits mit dem Operator ODER verknüpft werden. So werden Disjunktionen („entweder A oder B oder beide“) formuliert. Zur Darstellung von Negationen („wenn A inaktiv ist, ist B aktiv“) wird der Operator ‚NICHT‘ verwendet. Er wird durch ein ‚ $!$ ‘ symbolisiert.

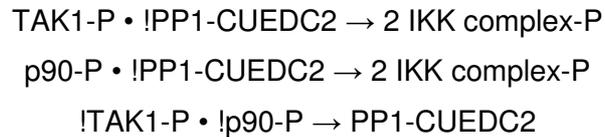
Die Formulierung der logischen Funktionen in der disjunktiven Normalform erleichtert die graphische Darstellung des logischen Modells als logischer Interaktionshypergraph (Klamt et al 2006). In einem solchen Graphen wird jeder Konjunktionsterm durch eine Hyperkante repräsentiert (de Jong 2002). Dies ist eine Kante, die Start- mit Endknoten von jeweils beliebiger Zahl verbindet. Mathematisch ausgedrückt können Start- und Endknoten einer Hyperkante die Kardinalität ≥ 1 haben, während sie im Fall einer einfachen Kante 1 ist. Hyperkanten sind daher Generalisierungen von Kanten. Einige Hyperkanten im logischen Interaktionshypergraphen entsprechen einfachen Kanten, da sie nur einen Startknoten mit einem Endknoten verbinden. Die durch den Endknoten einer Hyperkante repräsentierte Komponente kann durch zwei oder mehr voneinander unabhängige Interaktionen (Hyperkanten) aktiviert oder inhibiert werden. Solche durch Hyperkanten mit demselben Endknoten repräsentierte Interaktionen werden durch ein logisches ODER verknüpft. Ein logischer Interaktionshypergraph ist daher im Gegensatz zu einem Interaktionsgraphen eine graphische Darstellung der logischen Verknüpfungen des Modells.

Die alternativen Darstellungen des Modells als Liste logischer Funktionen einerseits und als logischer Interaktionshypergraph andererseits lassen sich am Beispiel der Aktivierung des IKK-Komplexes im Modell veranschaulichen. Die hohe Aktivität (Aktivitätszustand ‚2‘) des IKK-Komplexes kann auf zwei alternative Weisen eintreten. Zum einen kann der IKK-Komplex durch TGF- β activated kinase 1 (TAK1) voll aktiviert werden. Alternativ kann dies die phosphorylierte Kinase Protein 90 ribosomal protein S6 kinase (p90-P) bewirken. In beiden Fällen muss zudem der Phosphatase-Komplex Protein phosphatase 1 und CUE domain containing 2 (PP1-CUEDC2) inaktiv sein. Letzteres ist dann der Fall, wenn entweder

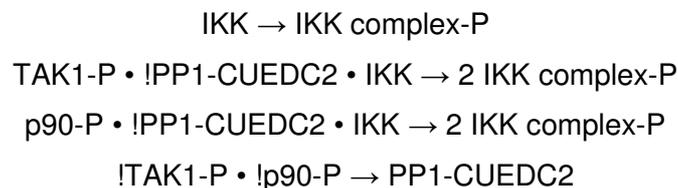
* Ein Konjunktionsterm ist eine Boolesche Funktion, die durch UND-Verknüpfung von einfachen Aussagen zusammengesetzt ist.

Material und Methoden

TAK1-P oder p90-P aktiv ist. Gemäß dem erläuterten Formalismus beschreibt der Term auf der linken Seite jeder logischen Funktion eine hinreichende Bedingung für die Aktivität der Komponente auf der rechten Seite des Pfeils:



Nach der ersten logischen Funktion ist der IKK-Komplex voll aktiv (,2'), wenn TAK1 phosphoryliert (,1') UND PP1-CUEDC2 NICHT aktiv (,0') ist. Alternativ dazu erreicht der IKK-Komplex gemäß der zweiten logischen Funktion eine hohe Aktivität, wenn p90 phosphoryliert (,1') ist UND PP1-CUEDC2 inaktiv ist. Die oberen beiden logischen Funktionen stellen also alternative Möglichkeiten zur starken Aktivierung des IKK-Komplexes dar, die sich nicht gegenseitig ausschließen. Sie repräsentieren daher gemeinsam eine logische ‚ODER'-Verknüpfung. Gemäß der dritten logischen Funktion ist die Abwesenheit der phosphorylierten Formen von TAK1 UND p90 eine hinreichende Bedingung für die Aktivität von PP1-CUEDC2. Jedoch sind mit diesen logischen Funktionen die Bedingungen für die niedrige (basale, d. h. unstimulierte) Aktivität des IKK-Komplexes nicht definiert. Da diese aber Einfluss auf die DNA-Schadens-Antwort hat, wurde sie durch eine Erweiterung dieser Funktionen im Modell implementiert. Dabei musste aufgrund der Funktionsweise des Algorithmus im *CellNetAnalyzer* die Komponente ‚IKK complex' (unphosphorylierter IKK-Komplex) in das Modell aufgenommen werden. Die Anwesenheit des unphosphorylierten IKK-Komplexes ist sowohl für die basale (niedrige) (,1') als auch für die hohe (,2') Aktivität von ‚IKK complex-P' eine notwendige Voraussetzung. Entsprechend wird die Aktivität des IKK-Komplexes im Modell wie folgt reguliert:



Wie die oberste Funktion ausdrückt, erreicht der IKK-Komplex seinen basalen Phosphorylierungszustand (,1') unabhängig davon, ob die Phosphatase PP1-CUEDC2 aktiv ist oder nicht, sie taucht daher nicht in dieser Funktion auf. Ist hingegen keine dieser hinreichenden Bedingungen für die Aktivität des IKK-Komplexes erfüllt, ist dieser inaktiv. Während die Darstellung dieser Interaktionen im Interaktionsgraphen (Abb. 3.2A) lediglich für

jede Interaktion anzeigt, ob es sich um Aktivierungen oder Inhibitionen handelt, bildet der logische Interaktionshypergraph (Abb. 3.2B) jede logische Funktion als Hyperkante ab.

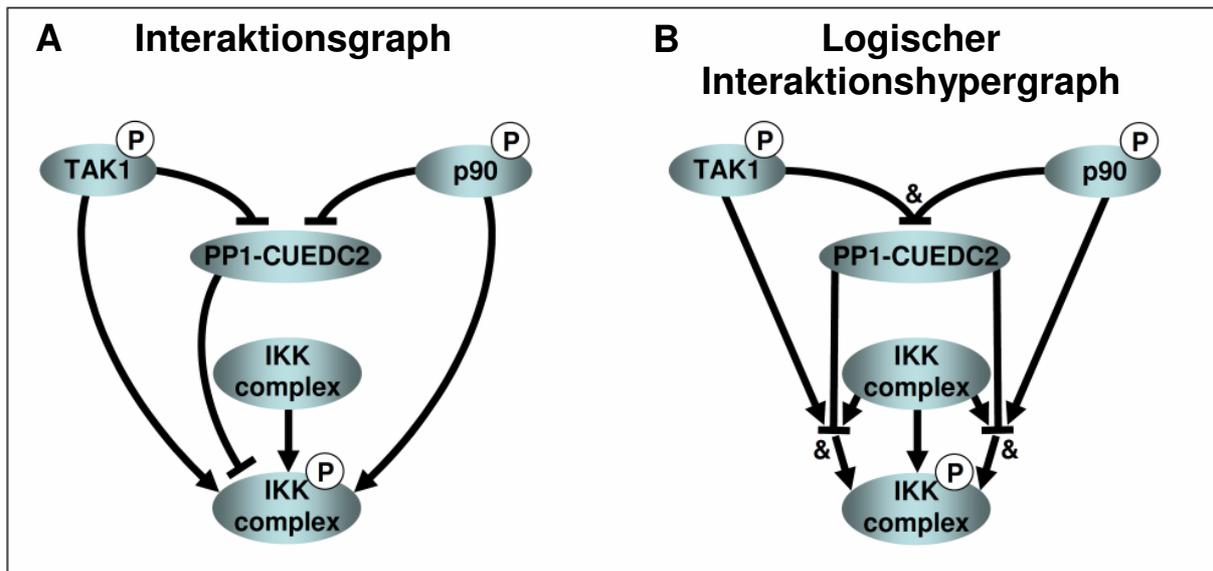


Abb. 3.2 Interaktionsgraph und logischer Interaktionshypergraph. A) Die Darstellung des Netzwerks als Interaktionsgraph bildete die Basis einiger struktureller Analysen. Dieser Graph besteht aus Knoten (regulatorischen Komponenten), die über gerichtete Kanten (gerichtete Interaktionen) verbunden sind. Aktivierungen werden durch Pfeile, Inhibitionen durch T-förmige Kanten symbolisiert. B) Im logischen Interaktionshypergraphen sind die Knoten durch Hyperkanten verknüpft. Das sind gerichtete Kanten mit beliebiger Zahl an Start- und Endknoten. Hyperkanten können Interaktionen zwischen mehr als zwei regulatorischen Komponenten darstellen. Im einfachsten Fall verknüpfen Hyperkanten nur einen Start- mit einem Endknoten. Diese entsprechen Einzelaussagen, wie im Beispiel der basalen (unstimulierten) Aktivierung des IKK-Komplexes. Alle anderen Hyperkanten entsprechen UND-Verknüpfungen von zwei oder mehreren Komponenten. Hyperkanten mit demselben Endknoten entsprechen alternativen Möglichkeiten der Aktivierung oder Inhibition und stellen daher ODER-Verknüpfungen dar. Die dem in (A) abgebildeten Interaktionsgraphen sowie dem in (B) gezeigten logischen Interaktionshypergraphen entsprechenden logischen Funktionen sind im Text aufgeführt.

Um strukturelle Analysen des Modells in verschiedenen Phasen nach dem Auftreten von DNA-Schäden zu ermöglichen, wurde jeder logischen Funktion ein Zeitskalenwert zugeordnet. Früheren Interaktionen wurde dabei ein niedrigerer Zeitskalenwert als späteren Interaktionen zugeordnet (Klamt et al 2007). Die Darstellung der Zeit als diskrete Größe wurde dem Umstand gerecht, dass Reaktionsgeschwindigkeiten *in vivo* (in der Zelle) sowie die zeitlichen Abfolgen von Signaltransduktionsnetzwerken zumeist unbekannt waren, sich aber dennoch eingrenzen ließen.

Für Analysen mit *CellNetAnalyzer* wurde der logische Interaktionshypergraph mit *CellDesigner* gezeichnet und in *CellNetAnalyzer* importiert; zusätzlich wurde das logische Modell in *CellNetAnalyzer* durch logische Funktionen definiert; einige Analysen mit *CellNetAnalyzer* erfolgten auf der Basis des Interaktionsgraphen, der durch automatisierte Spaltung aller Hyperkanten des logischen Interaktionshypergraphen in die zugrunde liegenden Kanten generiert wurde. Analysen mit *GINsim* wurden auf Basis des Interaktionsgraphen durchgeführt, der mit diesem Tool gezeichnet wurde, wobei das logische Modell durch logische Funktionen definiert wurde. Analysen mit *MAVisto* erfolgten auf Basis des Interaktionsgraphen, der mit diesem Tool gezeichnet wurde.

3.2.3 Strukturelle Analysen

Viele funktionelle Einsichten in Signaltransduktionsnetzwerke lassen sich durch strukturelle Analysen des logischen Interaktionshypergraphen und des Interaktionsgraphen gewinnen (Klamt et al 2006). Dazu gehören die Identifizierung kausaler Beziehungen zwischen Komponenten, die im Netzwerk weit voneinander entfernt liegen, die Ermittlung aller Signalwege zwischen zwei beliebigen regulatorischen Komponenten und die Analyse vieler grundlegender Eigenschaften des Systems (Klamt et al 2006). Selbst einige Einsichten in die Dynamik des untersuchten Netzwerks können mit strukturellen Analysen gewonnen werden, da viele dynamische Eigenschaften von der Struktur des Netzwerks abhängen (Gagneur und Casari 2005, Alon 2007a).

Paarweise Abhängigkeiten zwischen regulatorischen Komponenten im Modell wurden mithilfe der Abhängigkeitsmatrix untersucht, die mit *CellNetAnalyzer* auf Basis des Interaktionsgraphen generiert wurde. Diese Matrix* stellt funktionelle Beziehungen zwischen beliebigen Paaren von regulatorischen Komponenten umfassend dar (Klamt et al 2006). Alle regulatorischen Komponenten des Modells sind sowohl in Reihen als auch in Spalten aufgeführt. Die Farbe eines Matrixelements M_{ij} spiegelt für jedes geordnete Paar von Komponenten (i, j) die funktionelle Wirkung von i (Zeile) auf j (Spalte) wieder. Dabei werden sechs Fälle funktioneller Beziehungen unterschieden:

- i ist ein starker Aktivator von j , wenn alle Pfade von i zu j positiv sind und keine Komponente innerhalb dieser Pfade in einen negativen Feedback-Loop eingebunden ist; das entsprechende Matrixelement ist dunkelgrün
- i ist ein schwacher Aktivator von j , wenn alle Pfade von i zu j positiv sind und mindestens eine Komponente innerhalb dieser Pfade in einen negativen Feedback-Loop eingebunden ist; das entsprechende Matrixelement ist hellgrün
- i ist ein starker Inhibitor von j , wenn alle Pfade von i zu j negativ sind und keine Komponente innerhalb dieser Pfade in einen negativen Feedback-Loop eingebunden ist; das entsprechende Matrixelement ist dunkelrot
- i ist ein schwacher Inhibitor von j , wenn alle Pfade von i zu j negativ sind und mindestens eine Komponente innerhalb dieser Pfade in einen negativen Feedback-Loop eingebunden ist; das entsprechende Matrixelement ist hellrot
- i ist ein Ambivalenzfaktor für j , wenn sowohl positive als auch negative Pfade von i zu j führen; das entsprechende Matrixelement ist gelb
- i hat keinen Effekt auf j , wenn keine Pfade von i zu j führen; das entsprechende Matrixelement ist schwarz

* Eine Matrix ist eine rechteckige Anordnung von Elementen zur Darstellung von Zusammenhängen.

Material und Methoden

Ferner lässt sich mit Hilfe der Abhängigkeitsmatrix der Zusammenhang eines Graphen untersuchen (Klamt et al 2007). Zwei Knoten eines Graphen sind zusammenhängend, wenn sie über Kanten verbunden sind.

Signaltransduktionsnetzwerke enthalten strukturelle Motive, die in einem gegebenen Netzwerk häufiger als in Zufallsnetzwerken¹ vorkommen. Jedes dieser als Netzwerk motive bezeichneten Teilnetzwerke kann spezifische Funktionen in der Signalverarbeitung erfüllen und damit die dynamischen Eigenschaften des Netzwerks beeinflussen (Alon 2007a). In der vorliegenden Arbeit wurde mit *MAVisto* nach Netzwerk motiven im Interaktionsgraphen gesucht. Dazu wurde mit dem so genannten Frequenzkonzept *F1* gesucht, gemäß dem Netzwerk motive sowohl Knoten als auch Kanten teilen, also überlappen können. Zudem erfolgte mit *MAVisto* die Errechnung des *p*-Wertes (Signifikanzwertes) jedes Netzwerk motivs. Der *p*-Wert eines Netzwerk motivs kann zwischen 0 und 1 liegen und ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Häufigkeit des Netzwerk motivs in einem Zufallsnetzwerk gleich oder größer als die Häufigkeit im untersuchten Netzwerk ist (Maslov et al 2003). Wie von Milo et al 2002 durchgeführt und in der Bedienungsanleitung für *MAVisto* empfohlen, wurde zur Berechnung des *p*-Wertes die mittlere Häufigkeit jedes Netzwerk motivs in 1000 Zufallsnetzwerken herangezogen. Die Erzeugung dieser randomisierten Versionen des untersuchten Interaktionsgraphen geschah durch einen Algorithmus in *MAVisto*. Zur Generierung der Zufallsnetzwerke wurde der Grad² jedes Knotens konstant gehalten, während die Auswahl seiner Interaktionspartner zufällig erfolgte. So wurden in einem Randomisierungsschritt zwei Kanten (Knoten *A* → Knoten *B*) und (Knoten *C* → Knoten *D*) derart neu angeordnet, dass nun stattdessen Knoten *A* mit Knoten *D* und Knoten *C* mit Knoten *B* verbunden wurden, sofern diese Kanten nicht bereits im Netzwerk existierten. Um den Typ jeder Kante (aktivierend oder inhibierend) bei den Randomisierungen zu erhalten, wurde zuvor die Option „*Consider edge labels*“ gewählt. Damit wurden Netzwerk motive, die sich nur in den Typen (aktivierend oder inhibierend) ihrer Kanten unterscheiden, als verschiedene Netzwerk motive erkannt. Feedback-Loops wurden als einzige Netzwerk motive zusätzlich mit *GINsim* identifiziert, da dieses Tool auf Basis des logischen Modells für jeden Feedback-Loop die Ermittlung des Funktionalitätskontexts erlaubt. Während negative Feedback-Loops eine notwendige Voraussetzung für stabile Oszillationen oder Homöostase (physiologisches Gleichgewicht) sind, erfordert das Phänomen der Multistabilität³ positive Feedback-Loops (Thomas 1981, Thieffry 2007). Feedback-Loops, die diese Phänomene hervorrufen, sind funktionell. Entsprechend definiert der Funktionalitätskontext für das logische Modell, ob, und wenn ja, unter welchen Bedingungen ein gegebener Feedback-Loop im logischen Modell funktionell ist. Definiert werden diese Bedingungen über die Aktivitätszustände externer (nicht zum Feedback-Loop gehörender) Komponenten, welche den Feedback-Loop regulieren (Naldi et al 2007). Beispielsweise ist der von Ikbα und p50-

¹ Ein Zufallsnetzwerk ist ein Netzwerk mit derselben Zahl an Knoten und Kanten wie das reale Netzwerk, wobei die Knoten und Kanten aber zufällig angeordnet sind.

² Der Grad eines Knotens ist die Anzahl der Kanten, die diesen Knoten mit anderen Knoten verbinden.

³ Multistabilität bezeichnet hier die Eigenschaft von Netzwerken, alternative stationäre Zustände einzunehmen. Diese können beispielsweise alternativen zellulären Differenzierungszuständen entsprechen.

p53-P gebildete negative Feedback-Loop im linken Teil der Abb. 3.3 im logischen Netzwerk funktionell. Seinen Funktionalitätskontext bilden alle Zustände, in denen der phosphorylierte IKK-Komplex hoch aktiv (2) ist. Der im rechten Teil der Abb. 3.3 aus p53-P, MDM2 und Murine double minute X (MDMX) gebildete Feedback-Loop wird durch einen als Kurzschluss (graue Kante) wirkenden kleineren Feedback-Loop aus p53 und MDM2 inaktiviert. Dieser Kurzschluss wäre nur durch konstitutive Inaktivierung von MDM2 zu eliminieren, was jedoch auch die Inaktivierung des größeren Feedback-Loops mit sich brächte. Entsprechend ist der größere Feedback-Loop nicht funktionell, da kein einheitlicher Funktionalitätskontext für alle ihn zusammensetzenden Interaktionen existiert.

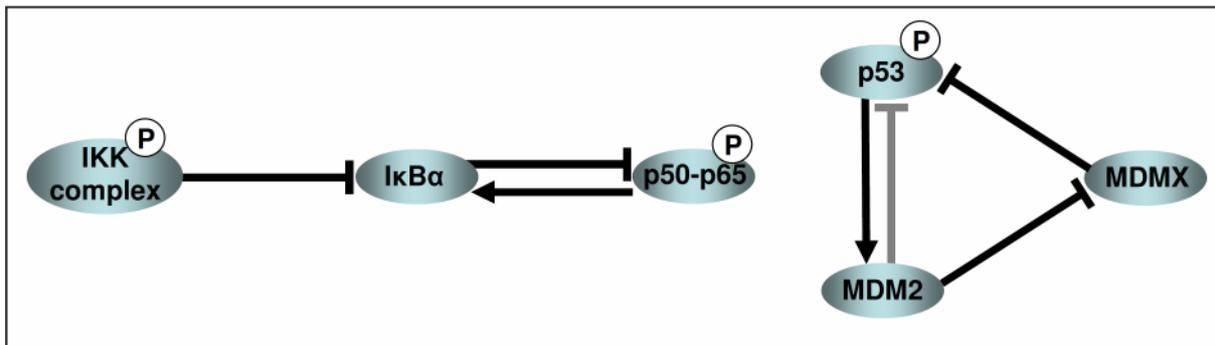


Abb. 3.3 Funktionalitätskontext von Feedback-Loops im logischen Modell. Der Funktionalitätskontext eines Feedback-Loops definiert die Bedingungen, unter denen dieser im logischen Netzwerk aktiv ist. Der Funktionalitätskontext des aus IκBα und phosphoryliertem p50-p65 gebildeten negativen Feedback-Loops wird durch alle Zustände gebildet, in denen der IKK-Komplex hoch aktiv (IKK-P = 2) ist, da nur dann IκBα abgebaut und p50-p65 durch Freisetzung und Phosphorylierung zur Expression seines Inhibitors IκBα angeregt wird. Der aus den Interaktionen zwischen phosphoryliertem p53, MDM2 und MDMX gebildete positive Feedback-Loop (schwarze Kanten) wird durch einen aus der Inhibition von p53-P durch MDM2 gebildeten Kurzschluss (graue Kante) inaktiviert. Dieser Kurzschluss wäre inaktiv, wenn auch MDM2 inaktiv wäre. Dann wäre jedoch auch der Feedback-Loop aus p53-P, MDM2 und MDMX inaktiv. Daher gibt es in *GINsim* keinen Zustand des Netzwerks, in denen dieser Feedback-Loop funktionell ist, daher ist er nicht funktionell.

Um die Identifizierung artifizierender Netzwerk motive auszuschließen, erfolgte vor der Analyse die Entfernung aller Kanten des Interaktionsgraphen, die keinen Interaktionen im eigentlichen Sinne *in vivo* entsprechen. Das betrifft die aktivierende Kante ‚DNA-SSBs → DNA-DSBs early‘; die für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen aus Einzelstrangbrüchen steht. Zudem betrifft es die Kante ‚DNA-DSBs-early → DNA-DSBs late‘, die ermöglicht, dass auch im Modell Doppelstrangbrüche im frühen Stadium andere Funktionen als im späten Stadium erfüllen.

Über die Berechnung von logischen stationären Zuständen (Klamt et al 2006) wurden qualitative Auswirkungen von DNA-schädigenden Agentien auf das Signaltransduktionsnetzwerk untersucht. Diese Berechnungen wurden mit *CellNetAnalyzer* auf der Basis des logischen Interaktionshypergraphen ausgeführt. Berechnungen von logischen stationären Zuständen erfolgten jeweils für einen definierten Zeitskalenwert. Die so ermittelten Zustände gelten daher nur für den definierten Zeitskalenwert und sind nicht zu verwechseln mit dem Attraktor des Netzwerks unter Berücksichtigung seiner gesamten zeitlichen Entwicklung. Auswirkungen von Inhibitionen und Mutationen, die zum Verlust der

Funktion eines Genprodukts führen (Funktionsverlust-Mutationen) wurden über die Berechnung des logischen stationären Zustands nach Fixierung des Aktivitätszustands des betreffenden Proteins auf ‚0‘ ermittelt. Zur Untersuchung von Auswirkungen von konstitutiven Aktivitäten wurde der Aktivitätszustand des betreffenden Proteins entsprechend auf den Wert ‚1‘ respektive ‚2‘ fixiert.

Zur Entwicklung potentieller Interventionsstrategien sowie für Auswirkungsanalysen (Analysen zum Auffinden potentieller Fehlermoden, engl. *failure mode analyses*) wurden Minimal Intervention Sets errechnet (Klamt et al 2006). Die Entwicklung von potentiellen Interventionsstrategien bezieht sich in dieser Arbeit auf die Identifizierung möglicher therapeutischer Zielstrukturen zur verbesserten Krebstherapie. Auswirkungsanalysen wurden zur Identifizierung von Zuständen des Netzwerks vorgenommen, die zur Karzinogenese beitragen könnten. Ein Minimal Intervention Set in Interaktionsnetzwerken ist eine minimale (d. h. nicht reduzierbare) Menge von Eingriffen, mit denen bestimmte Knoten zu aktivieren bzw. inaktivieren sind, um ein vom Anwender vorgegebenes Verhalten des Netzwerks zu erreichen. Vor jeder Errechnung wurde spezifiziert, ob dieses Verhalten des Netzwerks durch Inaktivierungen oder Aktivierungen (oder beides) von regulatorischen Komponenten erreicht werden soll. Die maximale Kardinalität der Minimal Intervention Sets wurde auf drei gesetzt, um Sets mit mehr Elementen auszuschließen. Dadurch wurden die Ergebnisse auf die potentiell bedeutsamsten Sets beschränkt. Die Errechnung erfolgte mit *CellNetAnalyzer* auf Basis des logischen Interaktionshypergraphen.

3.2.4 Dynamische Analysen

Der logische Interaktionshypergraph beschreibt die statische Struktur des logischen Netzwerks. Da Signaltransduktionsnetzwerke jedoch keine statische, sondern dynamische, also zeitlich veränderliche Systeme sind, ist für ihr Verständnis auch die Berücksichtigung der Dynamik beim Modellieren wichtig (Cho und Wolkenhauer 2003). Der logische Zustand eines diskreten logischen Netzwerks aus N Knoten zu einem Zeitpunkt t lässt sich durch einen so genannten Zustandsvektor* $x(t)$ repräsentieren. Dessen N Vektorkomponenten sind durch die Zustandsvariablen aller regulatorischen Komponenten des Netzwerks gegeben (Thomas 1991). So entspräche der Zustandsvektor $X(t) = [1, 0, 1]$ dem Zustand eines Netzwerks, in dem Protein 1 aktiv (‚1‘), Protein 2 inaktiv (‚0‘) und Protein 3 aktiv (‚1‘) ist. Durch Aktualisierung der Werte der Zustandsvariablen gemäß den logischen Funktionen ergibt sich der Zustand des Netzwerks zum nachfolgenden Zeitpunkt $t+1$. Sukzessive lassen sich so aufeinander folgende Zustände des Netzwerks ermitteln. Die resultierende zeitliche Abfolge von Zustandsübergängen wird als Trajektorie bezeichnet (Bornholdt 2008). Zur Veranschaulichung des dynamischen Verhaltens des Netzwerks werden Trajektorien graphisch in so genannten Zustandsübergangsgraphen (dynamischen Graphen) dargestellt

* Ein Vektor ist eine endliche Liste von als Komponenten bezeichneten reellen Zahlen.

(Xiao 2009, Chaouiya 2012) (Abb. 3.4). In einem solchen gerichteten Graphen repräsentiert jeder Knoten einen Vektor zur Beschreibung des Zustands des Netzwerks zu einem gegebenen Zeitpunkt. Die Knoten sind durch gerichtete Kanten verbunden, die mögliche Zustandsübergänge des Netzwerks symbolisieren. Ein Problem bei der Ermittlung von Zustandsübergängen ist, dass – wie oben erwähnt - die Reaktionsgeschwindigkeiten von Interaktionen in Signaltransduktionsnetzwerken zumeist unbekannt sind. Selbst Kenntnisse über die relativen Geschwindigkeiten parallel ablaufender Signalwege sind häufig unzureichend. Dies betrifft beispielsweise die durch DSBs induzierten Signalwege zur Aktivierung von p53 bzw. NF- κ B. Prinzipiell gibt es dann zwei alternative Möglichkeiten zur Wahl des Aktualisierungsschemas: synchron oder asynchron (Garg et al 2008) (Abb. 3.4). Im synchronen Fall werden alle regulatorischen Komponenten entsprechend den sie regulierenden logischen Funktionen gleichzeitig aktualisiert, so dass die Zustandsübergänge einer einzigen Trajektorie folgen. Jeder Zustand hat folglich höchstens einen direkten Vorgängerzustand (Garg et al 2008). Jedoch wechseln *in vivo* entgegen der zugrunde liegenden einfachen Annahme nicht alle regulatorischen Komponenten gleichzeitig ihre Aktivitätszustände; so laufen in Zellen beispielsweise Phosphorylierungen schneller ab als die Transkription. Daher wird das asynchrone Aktualisierungsschema (Abb. 3.4) häufiger angewendet (Klemm und Bornholdt 2005, Garg et al 2008). Hierbei entspricht jeder Zustandsübergang des Netzwerks der Aktualisierung nur einer einzigen (zufällig ausgewählten) regulatorischen Komponente. Da es alternative Trajektorien gibt, denen das Netzwerk folgen kann, ist das asynchrone Aktualisierungsschema nicht-deterministisch. Dabei werden alle möglichen Zustandsübergänge erfasst. Demzufolge kann ein Zustand mehrere direkte Folgezustände haben. Daher ist der asynchrone Zustandsübergangsgraph weitaus komplexer und der damit verbundene Rechenaufwand demgemäß höher als im synchronen Fall (Garg et al 2008). Um einerseits diesem Problem zu begegnen, und andererseits die oftmals begrenzt verfügbaren Informationen über zeitliche Abläufe in Signaltransduktionsnetzwerken einzubeziehen, wurde ein Aktualisierungsverfahren mit Prioritätsklassen vorgeschlagen (Fauré et al 2006). Im hier behandelten Modell wurden daher der Zuordnung zu den Zeitskalenwerten für die strukturellen Analysen entsprechend die Zustandsübergänge in eine zeitliche Rangfolge aus Prioritätsklassen eingeteilt. Dabei wurden für jede regulatorische Komponente alle Zustandsübergänge, die mit einer Erhöhung der Aktivität dieser Komponente einhergehen separat betrachtet von jenen Zustandsübergängen, die mit einer Verminderung ihrer Aktivität einhergehen. Für jede Komponente wurden diese beiden Typen von Zustandsübergängen dann jeweils einer Prioritätsklasse zugeordnet. Insgesamt wurden drei Prioritätsklassen gebildet. Da die Dynamik innerhalb der Prioritätsklassen unbekannt war, wurde innerhalb jeder Klasse asynchron aktualisiert. Dementsprechend wurden die Netzwerkzustände zunächst gemäß

den Zustandsübergängen der ersten Prioritätsklasse asynchron aktualisiert. Darauf folgte das asynchrone Aktualisieren unter Einbezug der zweiten und schließlich der dritten Prioritätsklasse. Der so berechnete Zustandsübergangsgraph gibt das dynamische Verhalten des Netzwerks unter Berücksichtigung bekannter Aufeinanderfolgen der Interaktionen *in vivo* wieder. Asynchrones Aktualisieren war damit auf Zustandsübergänge beschränkt, über deren zeitliche Reihenfolge keine Informationen vorlagen.

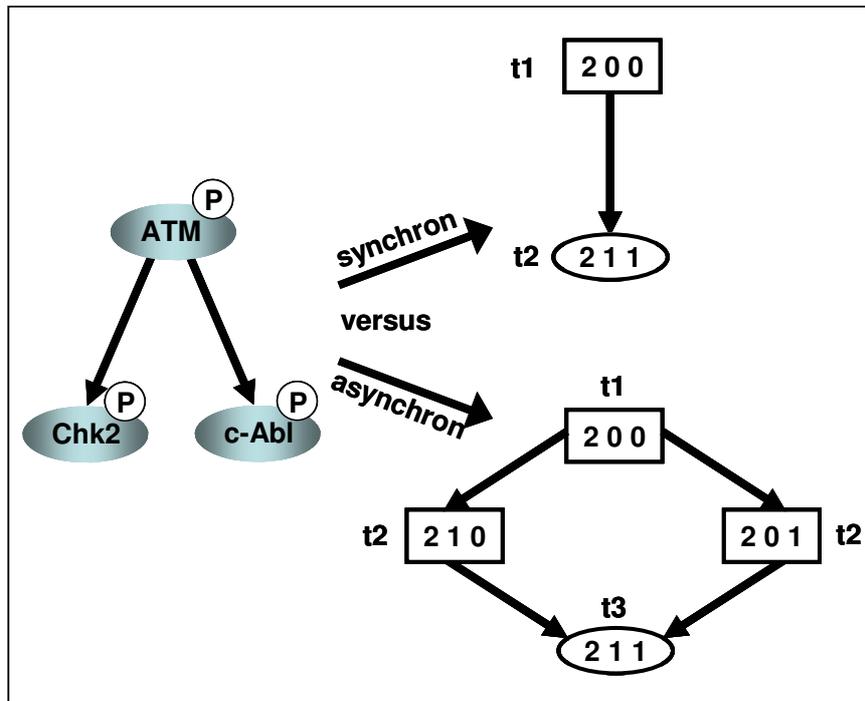


Abb. 3.4 Zustandsübergangsgraphen eines Netzwerks. Das zeitliche Verhalten eines Netzwerks (links) lässt sich mit Zustandsübergangsgraphen (rechts) abbilden. In diesen Graphen repräsentiert jeder Knoten den Zustand des Netzwerks zu einem Zeitpunkt t_1 , wobei jede Zahl den Aktivitätszustand einer regulatorischen Komponente zu diesem Zeitpunkt wiedergibt. Diese Liste von Zahlen eines Knotens wird als Zustandsvektor des Netzwerks zum Zeitpunkt t_1 bezeichnet. Für das Beispielnetzwerk aus ‚ATM-P‘, ‚Chk2-P‘ und ‚c-Abl-P‘ (phosphorylierte Tyrosine-protein kinase ABL1) gibt der Zustandsvektor ‚2 0 0‘ die Aktivitätszustände von ‚ATM-P‘ (‚2‘), ‚Chk2-P‘ (0) und ‚c-Abl-P‘ (‚0‘) im Ausgangszustand t_1 wieder. Durch Anwendung der logischen Funktionen werden die Aktivitätszustände der regulatorischen Komponenten aktualisiert, wobei das Netzwerk in einen nachfolgenden Zustand zum Zeitpunkt t_2 übergeht, der sich durch andere Aktivitätszustände auszeichnet. Jeder dieser möglichen als Zustandsübergänge des Netzwerks bezeichneten Vorgänge wird im Zustandsübergangsgraphen durch einen Pfeil symbolisiert. Die Aktualisierung der Aktivitätszustände kann auf zwei alternative Weisen erfolgen. Im synchronen Fall werden alle Aktivitätszustände gleichzeitig (synchron) aktualisiert, im Beispiel werden ‚Chk2-P‘ und ‚c-Abl-P‘ gleichzeitig durch ‚ATM-P‘ aktiviert, der resultierende Zustandsvektor des Netzwerks zum Zeitpunkt t_2 ist also durch ‚2 1 1‘ gegeben. In der Zelle laufen jedoch Interaktionen unterschiedlich schnell ab. Realitätsnäher als das synchrone ist daher das asynchrone Aktualisierungsschema, in dem jeder Zustandsübergang die Aktualisierung nur einer Komponente darstellt. Da alle möglichen Zustandsübergänge im Zustandsübergangsgraphen dargestellt werden, ist es komplexer als im synchronen Fall. Das Beispielnetzwerk kann bei asynchronem Aktualisieren vom Ausgangszustand t_1 in zwei alternative Zustände t_2 übergehen, je nachdem, ob ‚ATM-P‘ zuerst ‚Chk2-P‘ oder ‚c-Abl-P‘ aktiviert (‚2 1 0‘ bzw. ‚2 0 1‘). Wie im synchronen Fall ist der finale (hier zum Zeitpunkt t_3) Zustandsvektor ‚2 1 1‘.

Ein wichtiges Merkmal diskreter logischer Modelle ist die Endlichkeit des Zustandsraums, also der Menge aller möglichen Zustände, welche diese dynamischen Systeme einnehmen können (Albert und Wang 2009). Beispielsweise ergeben sich für ein Netzwerk mit drei regulatorische Komponenten, deren Aktivitäten durch binäre Zustandsvariable repräsentiert werden, theoretisch $2 \cdot 2 \cdot 2 = 8$ mögliche Zustände. Die meisten dieser Zustände sind transient und werden daher bei Anwendung der logischen Funktionen wieder verlassen. Jede Trajektorie führt zum Eintritt des Netzwerks in einen Attraktor, eine Untermenge des

Zustandsraums, die unter gegebenen Bedingungen nicht mehr verlassen werden kann (Klemm und Bornholdt 2005). Attraktoren werden in Fixpunktattraktoren (logische stationäre Zustände, engl. *logical steady states*) und zyklische Attraktoren klassifiziert. Während erstere aus nur einem Zustand bestehen, sind letztere durch periodische Zyklen von Zuständen charakterisiert (Albert und Wang 2009). Zyklische Attraktoren werden wiederum in einfache Schleifen (engl. *simple loops*) und komplexe Schleifen (engl. *complex loops*) unterteilt. In einfachen Schleifen hat jeder Zustand nur einen direkten Folgezustand. Demgegenüber setzen sich komplexe Schleifen aus zwei oder mehreren einfachen Schleifen zusammen, wobei ein Zustand alternative direkte Folgezustände haben kann (Garg et al 2008). Komplexe Schleifen treten nur im asynchronen Zustandsübergangsgraphen auf, während sie im synchronen Zustandsübergangsgraphen als einfache Schleifen erscheinen (Garg et al 2008). Demgegenüber können Fixpunktattraktoren logischer Modelle in synchronen und asynchronen Aktualisierungsschemata gleichermaßen identifiziert werden (Garg et al 2008). Je größer der Zustandsübergangsgraph ist, desto schwieriger ist das visuelle Auffinden der Attraktoren. Identifiziert wurden sie in dieser Arbeit daher als so genannte terminale stark zusammenhängende Graphen-Komponenten. Darunter versteht man in der Graphentheorie am Ende von Pfaden (hier: Trajektorien) liegende Subgraphen (hier: Teile des Zustandsübergangsgraphens), die sich durch gerichtete Verbindungen (Trajektorien) von jedem Knoten zu jedem anderen Knoten des Subgraphens auszeichnen. Dieses Kriterium erfüllen im Zustandsübergangsgraphen nur Attraktoren (Naldi et al 2009). *In vivo* können Attraktoren logischer Signaltransduktionsmodelle zellulären Zuständen entsprechen, wie ausdifferenzierten Stadien (Fixpunktattraktoren) oder Zellzyklusprogression (zyklischer Attraktor) (Huang und Ingber 2000).

3.2.5 Netzwerkreduktion

Um einerseits das Netzwerk übersichtlicher zu gestalten und andererseits bei der Errechnung von Zustandsübergangsgraphen eine kombinatorische Explosion der Zahl an Zuständen zu vermeiden, wurde das Modell reduziert. Die Reduktion wurde mit einem Algorithmus in *GINSim* durchgeführt. In diesem Verfahren wird eine regulatorische Komponente entfernt, indem ihre Regulatoren direkt mit ihren regulierten Komponenten verbunden werden. So lässt sich aus der Signaltransduktionskaskade ‚MEK-P → ERK-P → p90-P‘ die regulatorische Komponente ‚ERK-P‘ entfernen, woraus die verkürzte Kaskade ‚MEK-P → p90-P‘ folgt. In dieser reduzierten Form aktiviert MEK-P die Komponente p90-P direkt. Aus der iterativen Entfernung zahlreicher regulatorischer Komponenten eines detaillierten Modells resultiert ein reduziertes Modell. Erlaubt ist das Entfernen von Komponenten, sofern sie keiner Autoregulation unterliegen. Im Interaktionsgraphen wird eine Autoregulation durch einen Selbstschleife (engl. *self loop*) dargestellt, also eine Kante, deren

Start- mit ihrem Endknoten identisch ist. Autoregulation stellt somit den kleinstmöglichen Feedback-Loop dar. Der Ausschluss autoregulierter Komponenten von der Netzwerkreduktion gewährleistete daher die Erhaltung aller Feedback-Loops mindestens in dieser kleinstmöglichen Form. Da funktionelle positive Feedback-Loops eine notwendige Voraussetzung für die Generierung von zwei oder mehr alternativen Attraktoren sind und funktionelle negative Feedback-Loops für zyklischen Attraktoren essentiell sind, ist somit der Erhalt der Attraktoren des Netzwerks während des Reduktionsprozesses gewährleistet (Naldi et al 2011).

3.2.6 Validierung des Modells

Eine Validierung des Modells erfolgte durch Vergleich von Prädiktionen mit experimentellen und klinischen Daten aus der Literatur.

4. Ergebnisse

4.1 Logisches Modell der DNA-Schadens-Antwort

Basierend auf definierten Qualitätskriterien wurden Literaturdaten ausgewählt und zur Erstellung eines diskreten logischen Modells der SSBs- und DSBs-induzierten Signaltransduktion humaner Epithelzellen verwendet. Das Modell umfasst 96 regulatorische Komponenten und 98 Interaktionen. Es ist durch einen logischen Interaktionshypergraphen (Abb. 4.1) und eine Liste logischer Funktionen (Anhang 1) repräsentiert. Die Nummern der Hyperkanten in Abb. 4.1 entsprechen den Nummern der logischen Funktionen in Anhang 1. Die Erstellung dieses Modells erfolgte auf der Basis von Vorarbeiten von Dr. Raimo Franke (Anhang 2). Alle Inhalte der Vorarbeit wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit nochmals gemäß den Qualitätskriterien (siehe Material und Methoden) überprüft. Das Netzwerk hat eine für Signaltransduktionsnetzwerke typische Struktur: Induziert wird die Signaltransduktion durch Eingangssignale. Diese sind durch chemische und physikalische Agenzien gegeben, welche die DNA schädigen; von der geschädigten DNA werden Signale über Komponenten in der Intermediär-Ebene weitergeleitet, wobei es zu einer Verarbeitung der Signale kommt; schließlich erreichen die Signale die Komponenten der Ausgangs-Ebene (CELL CYCLE ARREST und ONSET OF APOPTOSIS). Die Bezeichnung ‚ONSET OF APOPTOSIS‘ (engl., Beginn der Apoptose) soll verdeutlichen, dass die Aktivierung dieses Ausgangs-Elements der Einleitung der Apoptose, nicht aber notwendigerweise ihrem vollständigen Ablauf, also dem Eintritt des Zelltods, entspricht. Die Aktivitätszustände der meisten regulatorischen Komponenten (Knoten) sind durch binäre (zweiwertige, also Boolesche) Variable mit den Werten ‚0‘ (inaktiv) oder ‚1‘ (aktiv) repräsentiert. Die Aktivitätszustände der Komponenten ATM-P, IKK-P und I κ B α werden hingegen durch ternäre (dreiwertige) Variable repräsentiert. Auf diese Weise wurde der Beobachtung Rechnung getragen, dass diese Komponenten bei niedriger Aktivität (‚1‘) andere Funktionen als bei hoher Aktivität (‚2‘) erfüllen. So führt eine niedrige Aktivität (‚1‘) von ATM-P zur Inaktivierung von Protein phosphatase 2 A (PP2A) (Interaktion 22, Guo et al 2002). Sobald PP2A inaktiviert ist, können DSBs eine hohe Aktivität (‚2‘) der Komponente ATM-P induzieren, so dass diese nun weitere Substratproteine phosphorylieren kann (Interaktion 23, Goodarzi et al 2004). Der IKK-Komplex weist eine niedrige basale Aktivität (‚1‘) auf, die für einen partiellen Abbau von I κ B α , also eine Senkung von dessen Aktivität von ‚2‘ auf ‚1‘ ausreicht. Das wiederum führt auch ohne induzierte DNA-Schäden zur Aktivierung von Proto-oncogene c-Rel (c-Rel) (Interaktion 67, Xu et al 2008, Kenneth et al 2010). Infolge einer Induktion von DNA-Schäden erreicht der IKK-Komplex eine hohe Aktivität (‚2‘), die einen weitergehenden Abbau von I κ B α (I κ B α erreicht den Aktivitätszustand ‚0‘) ermöglicht.

Ergebnisse

Dies führt zur nukleären Translokation der NF- κ B-Dimere p50-p65 und p50-p50 (Interaktionen 68 und 69, McCool und Miyamoto 2012). Für einige strukturelle Analysen wurde den limitierten Informationen über den zeitlichen Ablauf von Interaktionen entsprechend allen Interaktionen bzw. logischen Funktionen einer von drei Zeitskalenwerten zugeordnet. Den konstituierenden Interaktionen der Signalwege, die von der geschädigten DNA zur Aktivierung bzw. Inaktivierung jener Komponenten führen, welche direkt mit den Komponenten CELL CYCLE ARREST oder ONSET OF APOPTOSIS verbunden sind (z. B. Transkriptionsfaktoren), wurde der Zeitskalenwert 1 (früheste Phase der DNA-Schadens-Antwort) zugeordnet. Ausnahmen innerhalb dieser Signalwege bilden Interaktionen, die gemäß Literaturdaten mit ausgeprägter Verzögerung ablaufen und denen daher der Zeitskalenwert 2 zugeordnet wurde. Entsprechend wurde beispielsweise der Bindung von NEMO an p53-induced protein with a death domain (PIDD) (Interaktion 44, Janssens et al 2005) der Zeitskalenwert 1 zugeordnet, während der später erfolgenden Bindung von NEMO an RIP1-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain (RAIDD) (Interaktion 43, Janssens et al 2005) der Zeitskalenwert 2 zugeordnet wurde. Auch Interaktionen, an denen die Komponenten CELL CYCLE ARREST oder ONSET OF APOPTOSIS direkt beteiligt sind, wurde der Zeitskalenwert 2 zugeordnet. Der Aktivierung von Proteinen, die Teile der DNA-Schadens-Antwort ausschalten, wurde der Zeitskalenwert 3 zugeteilt. Dies erfolgte auf Basis der Annahme, dass die Inaktivierung von zuvor aktivierten Signalwegen in der spätesten Phase der DNA-Schadens-Antwort erfolgt. So schaltet Wip1 Teile der DNA-Schadens-Antwort aus, indem diese Phosphatase ATM und andere Proteine dephosphoryliert (z. B. Interaktion 21, Shreeram et al 2006). Dementsprechend wurde der induzierten Expression von Wip1 (Interaktion 82, Fiscella et al 1997) der Zeitskalenwert 3 zugeteilt. Die Zeitskalenwerte aller logischen Funktionen sind in Anhang 1 vermerkt und detailliert begründet.

Die meisten Analysen erfolgten auf Basis der Berechnung logischer stationärer Zustände der DNA-Schadens-Antwort zum Zeitskalenwert 2, also bevor Feedbackmechanismen greifen. Die vorliegende Arbeit behandelt schwerpunktmäßig die Auswirkungen von Inhibitionen und molekularen Defekten auf den Zellzyklus-Arrest, die Apoptose und Anti-Apoptose. Wie aus den vorangegangenen Erläuterungen folgt, sind zum Zeitskalenwert 2 die meisten zum Zellzyklus-Arrest, zur Apoptose oder Anti-Apoptose führenden Signaltransduktionswege aktiv. Folglich ist zu diesem Zeitskalenwert die Sensibilität der Ergebnisse gegenüber Veränderungen in den Zuordnungen von Interaktionen zu Zeitskalenwerten minimal.

In den dynamischen Analysen wurde den limitierten Informationen über den zeitlichen Verlauf der Signaltransduktion mit der Definition von Prioritätsklassen Rechnung getragen (s. unten).

4.2 Validierung des Modells

Zur Validierung des Modells wurden die Ergebnisse von Simulationen anhand publizierter Studien über potentielle Zielstrukturen zur Sensibilisierung von Karzinomen (Tumoren des Epithels) für Therapien evaluiert (Tab. 4.1A). Für Simulationen von in der Literatur beschriebenen Auswirkungen von Inhibitionen auf die DNA-Schadens-Antwort wurden die betreffenden Proteine im Netzwerk inaktiviert, ein DNA-schädigender Stimulus aktiviert und anschließend der logische stationäre Zustand des Netzwerks zum Zeitskalenwert 2, also vor dem Eintritt von Feedback-Inhibitionen, errechnet. Ereignisse, die den Zelltod fördern, sind als sensibilisierend zu werten (Zhou und Bartek 2004). Zu solchen Ereignissen gehören insbesondere die Auslösung der mitotischen Katastrophe infolge der Blockade des Zellzyklus-Arrests (Portugal et al 2010) oder die Blockade der Aktivierung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nakanishi und Toi 2005).

Die Inaktivierung von ATM vor der Induktion von DSBs führte im Modell zur Repression aller zellulären Überlebensmechanismen (Zellzyklus-Arrest und Aktivierung von NF- κ B). Tatsächlich führte die Inaktivierung von ATM in Studien zu einer Sensibilisierung von Zellen für DSBs-induzierten Zelltod (Lavin 2008, Bolderson et al 2009, Tofilon und Camphausen 2009).

Inaktivierung von ATR im Modell blockierte zwei durch SSBs induzierte Signalwege, die Zellzyklus-Arrest bewirken (Inhibition der Expression von c-Myc, Aktivierung der Expression von p21), was eine erhöhte Mortalität von Zellen zur Folge haben sollte. Das deckt sich mit der berichteten Potenzierung der SSBs-induzierten Mortalität von Karzinomzellen durch Inaktivierung von ATR (Flatten et al 2005, Wagner und Kaufman 2010).

Die Inaktivierung von Chk1 blockierte einen der beiden Signaltransduktionswege im Modell, die zum Abbau der Phosphatase Cdc25A führen. Der Abbau von Cdc25A führt schließlich zum Zellzyklus-Arrest. Zusätzlich wurde einer der vier Signalwege reprimiert, die zur Aktivierung von p53 führen. Dieses Protein kann Apoptose und Zellzyklus-Arrest bewirken (Vousden und Prives 2009, Jiang et al 2010). Folglich beeinträchtigt der Verlust von funktionellem Chk1 sowohl Signalwege, die zum Zellzyklus-Arrest führen, als auch solche, die Apoptose bewirken. Die Simulationsergebnisse indizieren daher nicht, ob die Inhibition von Chk1 Zellen mit funktionellem p53 für Therapeutika sensibilisiert, die SSBs verursachen. Studien an Kulturen von Karzinomzellen mit funktionellem p53 haben gezeigt, dass Inhibitoren von Chk1 die zytotoxische Wirkung von TOP1-Inhibitoren verstärken. Dieser Effekt beruht auf der Verminderung des Vermögens der Zelle, in den Zellzyklus-Arrest einzutreten (Tse et al 2007, Ma et al 2011, Garret und Collins 2011).

Die Inaktivierung von Chk2 vor der Simulation der durch ionisierende Strahlung ausgelösten Signaltransduktion bewirkte ebenfalls die Blockade einer der beiden Signaltransduktionswege zur Proteolyse von Cdc25A. Zudem war auch die zum Zellzyklus-

Ergebnisse

Arrest führende Phosphorylierung von Cdc25C blockiert. Andererseits wurden auch die proapoptischen Komponenten PML-P-S117 und E2F-1-P nicht mehr aktiviert. Außerdem war einer der Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von p53 führen, gehemmt. Folglich führte die Inaktivierung von Chk2 im Modell zur Hemmung von Signalwegen zum Zellzyklus-Arrest und zur Apoptose. Die Simulation indizierte daher nicht, ob die Inhibition von Chk2 zur Sensibilisierung oder zur Desensibilisierung von Karzinomzellen mit funktionellem p53 für ionisierende Strahlung führt. In den meisten, aber nicht allen experimentellen Studien senkte die Inhibition von Chk2 die Absterberate von Zellen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung; Inhibitoren von Chk2 hatten hier also eine desensibilisierende Wirkung (Ma et al 2011, Garret und Collins 2011). Entsprechend bewahrte der Knockdown* von Chk2 vor der Behandlung mit ionisierender Strahlung Zellen der Karzinom-Zelllinie MIA PACa-2 vor dem Absterben (Morgan et al 2010).

Tab. 4.1A Validierung des Modells mit Literaturdaten: Wirkungen von Inhibitionen auf Zellen mit funktionellem p53

Inaktives Protein	Art des DNA-Schadens	Berichtete Effekte auf Zellen mit funktionellem p53	Referenzen	<i>In-silico</i> -Prädiktionen
ATM	DSBs	<ul style="list-style-type: none"> verminderte Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest Zelltod verstärkt 	Lavin 2008 Bolderson et al 2009 Tofilon und Camphausen 2009	<ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest blockiert Hemmung der Apoptose durch p50-p65-P blockiert Apoptose vermindert
ATR	SSBs	<ul style="list-style-type: none"> Zelltod verstärkt 	Flatten et al 2005 Wagner und Kaufmann 2010	<ul style="list-style-type: none"> verminderte Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest
Chk1	SSBs	<ul style="list-style-type: none"> verminderte Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest Zelltod verstärkt 	Tse et al 2007 Ma et al 2011 Garret und Collins 2011	<ul style="list-style-type: none"> Abbau von Cdc25A vermindert (Abbau von Cdc25A führt zum Zellzyklus-Arrest) Aktivierung von p53 (fördert Apoptose und Zellzyklus-Arrest) vermindert
Chk2	DSBs	<ul style="list-style-type: none"> Zelltod vermindert 	Morgan et al 2010 Ma et al 2011 Garret und Collins 2011	<ul style="list-style-type: none"> verminderte Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest Apoptose vermindert Aktivierung von p53 (fördert Apoptose und Zellzyklus-Arrest) vermindert
TAK1	SSBs	<ul style="list-style-type: none"> Zelltod verstärkt 	Martin et al 2011 Melisi et al 2011	<ul style="list-style-type: none"> verminderte Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest

Tab. 4.1B Validierung des Modells mit Literaturdaten: Wirkungen von Inhibitionen auf Zellen ohne funktionelles p53

Inaktives Protein	Art des DNA-Schadens	Berichtete Effekte auf Zellen ohne funktionelles p53	Referenzen	<i>In-silico</i> -Prädiktionen
ATM	DSBs	<ul style="list-style-type: none"> Zelltod verstärkt 	Jiang et al 2009	<ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest blockiert Hemmung der Apoptose durch p50-p65-P blockiert Apoptose vermindert
Chk1	SSBs	<ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest vermindert Zelltod verstärkt diese Effekte der Inhibition von Chk1 sind in p53-defizienten Zellen ausgeprägter als in Zellen mit funktionellem p53 	Tse et al 2007 Ma et al 2011 Garret und Collins 2011	<ul style="list-style-type: none"> Abbau von Cdc25A vermindert (Abbau von Cdc25A führt zum Zellzyklus-Arrest)
Chk2	DSBs	<ul style="list-style-type: none"> Zelltod verstärkt oder Zelltod nicht verstärkt? 	Jiang et al 2009 Anderson et al 2011	<ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest vermindert Apoptose vermindert

* Als Knockdown wird ein Verfahren zur gezielten Verminderung der Expression eines Proteins bezeichnet.

Ergebnisse

In der Simulation der vom TOP1-Inhibitor Camptothecin induzierten Signaltransduktion hemmte die Inaktivierung von TAK1 zwei Signaltransduktionswege zum Zellzyklus-Arrest (Inhibition der Expression von c-Myc, Aktivierung der Expression von p21). Das Ergebnis indiziert folglich eine Sensibilisierung der Zellen durch eine Inaktivierung von TAK1. Tatsächlich wurden Karzinomzellen durch den Knockdown von TAK1 für die Behandlung mit den TOP1-Inhibitoren Camptothecin bzw. SN38 sensibilisiert (Martin et al 2011, Melisi et al 2011).

Auch zur Sensibilisierung p53-defizienter Karzinome wurden potentielle therapeutische Zielmoleküle vorgeschlagen (Tab. 4.1B). Im Modell wurde die Wirkung des TOP2-Inhibitors Doxorubicin auf das Netzwerk ohne funktionelles p53 simuliert und die Ergebnisse mit denen der Simulation nach zusätzlicher Inaktivierung von ATM verglichen. In der Simulation mit funktionellem ATM und dysfunktionalem p53 aktivierte Doxorubicin vier Signaltransduktionswege, die dem Zelltod entgegenwirken: die Aktivierung von anti-apoptotischem NF- κ B sowie drei zum Zellzyklus-Arrest führende Signalwege ((i) die Inhibition der Expression von c-Myc, (ii) die Inhibition von Cdk2 und (iii) die Phosphorylierung von Cdc25C). Die zusätzliche Inaktivierung von ATM blockierte alle von Doxorubicin induzierten Signalwege zum Zellzyklus-Arrest und zur Aktivierung von NF- κ B und damit alle Überlebensmechanismen im Modell. Diese Ergebnisse stimmen mit experimentellen Befunden überein, wonach KU-55933, ein Inhibitor von ATM, p53-defiziente Karzinomzellen für Doxorubicin sensibilisiert. Auch wiesen p53-defiziente Brust- und Bronchialtumore ohne funktionelles ATM eine erhöhte Sensibilität für Chemotherapien auf (Jiang et al 2009).

Im p53-defizienten Modell verursachten TOP1-Inhibitoren Zellzyklus-Arrest. Zusätzliche Chk1-Defizienz blockierte einen der beiden Signalwege, die zur Proteolyse von Cdc25A führen, einer für den Zellzyklus essentiellen Phosphatase. Hingegen wurden pro-apoptotische Signalwege nicht durch Inaktivierung von Chk1 beeinträchtigt. Folglich deuten die Ergebnisse der Simulation auf eine sensibilisierende Wirkung von Chk1-Inhibitoren auf p53-defiziente Karzinomzellen hin. Tatsächlich ist die Sensibilisierung für TOP1-Inhibitoren durch Inhibition von Chk1 ausgeprägter, wenn die Zellen kein funktionelles p53 aufweisen. Das haben Experimente an Zellkulturen und vorklinische Studien gezeigt (Tse et al 2007, Ma et al 2011, Garret und Collins 2011).

Im p53-defizienten Modell reduzierte die Inaktivierung von Chk2 sowohl die Zahl der Signalwege zum Zellzyklus-Arrest als auch die Zahl pro-apoptotischer Signalwege in der Simulation der Behandlung mit TOP2-Inhibitoren. Die Sensibilität p53-defizienter Tumore für DSBs-induzierende Therapeutika kann durch Inhibition von Chk2 erhöht werden (Jiang et al 2009). Demgegenüber führte in einer anderen Studie die Inhibition von Chk2 in p53-defizienten Karzinomzelllinien zu keiner erhöhten Absterberate (Anderson et al 2011). Auf Karzinomzellen, in denen die nach Inaktivierung von p53 noch intakten Signalwege zum

Ergebnisse

Zellzyklus-Arrest (bzw. zur Apoptose) infolge weiterer Mutation auch unterbrochen sind, hätte die Inhibition von Chk2 hingegen eine erhöhte (bzw. verminderte) Absterberate nach Erzeugung von DNA-Schäden zur Folge. Die Simulationsergebnisse indizieren daher, dass die Wirkung der Inhibition von Chk2 auf p53-defiziente Karzinomzellen von der genetischen Konstitution der Zellen abhängen könnte.

Die Rekapitulation der meisten Literaturangaben über die Auswirkungen der Inaktivierung bestimmter Proteine auf die Sensibilität von Karzinomzellen gegenüber DNA-Schäden deutet auf die Eignung des Modells zur Generierung von Prädiktionen für Epithelzellen hin.

4.3 Funktionelle Abhängigkeiten im Netzwerk

Zur Untersuchung der Vernetzung der Signalwege in der DNA-Schadens-Antwort wurden kausale Beziehungen zwischen regulatorischen Komponenten identifiziert. Zwei Komponenten haben eine kausale Beziehung, wenn sie durch eine Folge aufeinander folgender Komponenten, einen Signalweg, verbunden sind. Diese funktionellen Abhängigkeiten sind in der Abhängigkeitsmatrix (Abb. 4.2) dargestellt.

Wie der hohe Anteil gelber Matrixelemente in Abb. 4.2 zeigt, ist in den meisten kausalen Beziehungen zwischen zwei Komponenten i und j die Komponente i ein Ambivalenzfaktor für j . Daher hat i in den meisten Fällen sowohl aktivierenden als auch inhibierenden Einfluss auf j , wobei diese gegensätzlichen Einflüsse zumeist zu unterschiedlichen Zeitskalenwerten aktiv werden. Beispielsweise wird Chk2 von ATM durch Phosphorylierung aktiviert (Interaktion 25, Melchionna et al 2000). Jedoch phosphoryliert ATM auch p53 (Interaktion 31, Fabbro et al 2004, Li et al 2006a), was zu einem späteren Zeitpunkt (Zeitskalenwert 3) zur Expression von Wip1 führt (Interaktion 82, Fiscella et al 1997). Diese Phosphatase wiederum deaktiviert Chk2 durch Dephosphorylierung (Interaktion 25, Fujimoto et al 2006). Folglich wirkt der Aktivierung von Chk2 durch ATM die ebenfalls von ATM abhängige Inaktivierung von Chk2 durch Wip1 entgegen. Somit ist ATM ein Ambivalenzfaktor für Chk2, wie ein gelbes Matrixelement in Abb. 4.2 ausdrückt.

Wie die Matrix auch zeigt, ist die pro-apoptotische Form von p53 (p53-PS15-PS20-PS46, kurz p53-P-PS46) ein schwacher Inhibitor (hellrotes Matrixelement) von NF- κ B (u. a. p50-p65-P). Diese inhibitorische Wirkung auf NF- κ B beruht auf der von p53 abhängigen Expression der Proteine Wip1 (Interaktion 82, Fiscella et al 1997), High temperature requirement protein A2 (HTRA2) (Interaktion 83, Dauth et al 2007, Jiang et al 2010) und Diablo (Interaktion 85, Yu et al 2007, Schuler und Green 2001). Wip1 dephosphoryliert ATM (Interaktionen 21 und 23, Shreeram et al 2006), HTRA2 hemmt XIAP (Interaktion 84, Srinivasula et al 2003, Martins et al 2002) und Diablo hemmt cIAP1 (Interaktion 86, Yang et al 2011). Die Beteiligung von ATM, XIAP und cIAP1 an der Aktivierung von NF- κ B (Abb. 4.1)

Ergebnisse

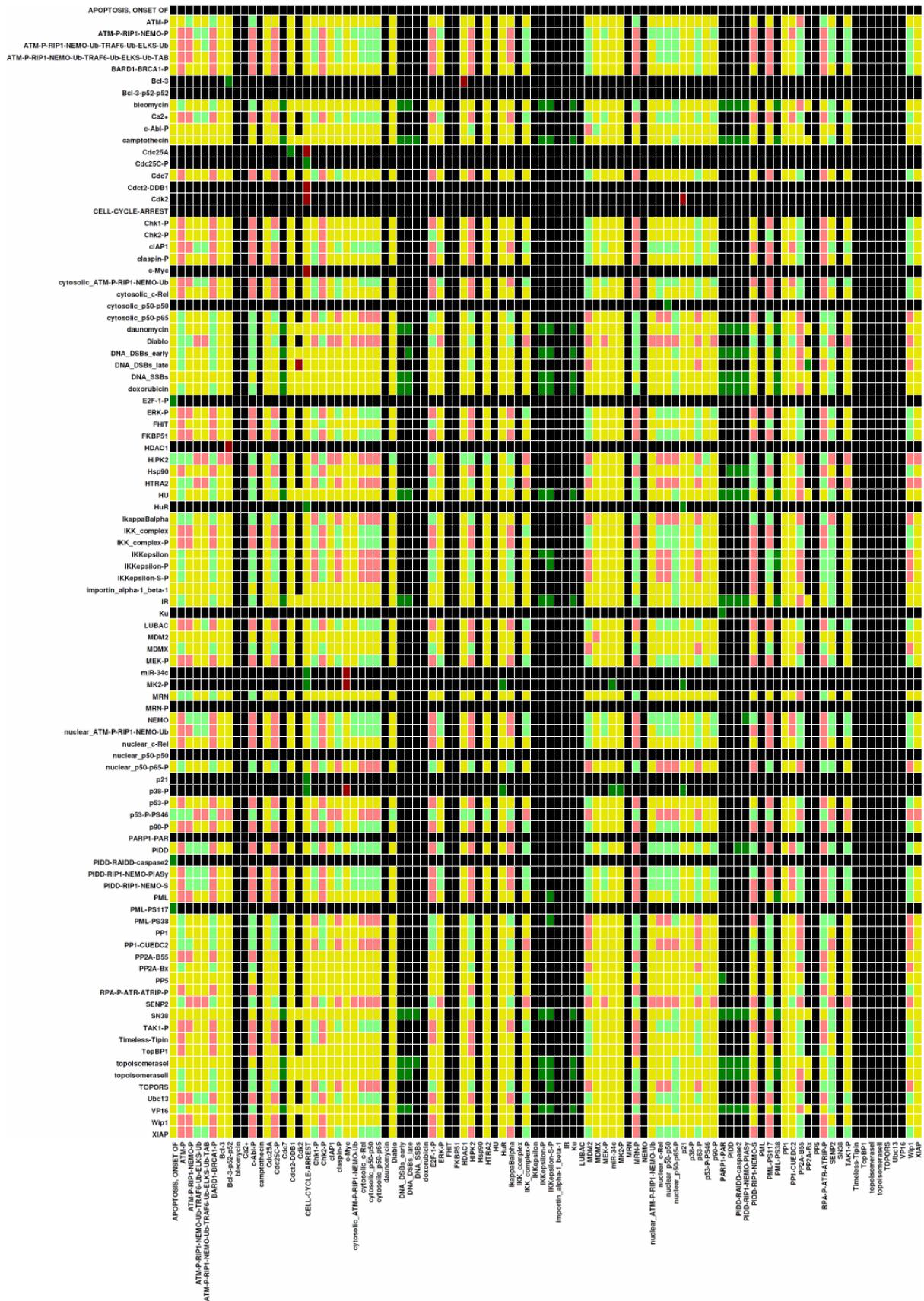


Abb. 4.2 Abhängigkeitsmatrix. Die Abhängigkeitsmatrix illustriert funktionelle Abhängigkeiten zwischen allen Paaren aus regulatorischen Komponenten. Die Farbe eines Matrixelementes M_{ij} definiert die Art des Einflusses einer Komponente i auf eine Komponente j : eine Komponente i ist entweder ein starker Aktivator (dunkelgrün), schwacher Aktivator (hellgrün), starker Inhibitor (dunkelrot), schwacher Inhibitor (hellrot) oder ein Ambivalenzfaktor (gelb) für die Komponente j . Alternativ kann i keinen Einfluss auf j haben (schwarz). Posttranslationale Modifikationen sind wie folgt gekennzeichnet: ‚-P‘ = Phosphorylierung, ‚-S‘ = Sumoylierung und ‚-Ub‘ = Ubiquitylierung.

Ergebnisse

erklärt die im Modell gefundene inhibitorische Wirkung von p53-P-PS46 auf NF- κ B.

Sowohl p53-P-PS46 als auch HTRA2 und Diablo sind schwache Aktivatoren (hellgrüne Matricelemente) von E2F-1-P und PML-PS117 (Abb. 4.2), die eine pro-apoptotische Wirkung haben (Stevens et al 2003, Dong et al 2003, Yang et al 2002). Über den mit dem Modell vorhergesagten aktivierenden Einfluss auf E2F-1-P und PML-PS117 könnte p53-P-PS46 seine pro-apoptotische Wirkung verstärken.

Die durch DSBs ausgelöste Phosphorylierung von MDMX führt zu dessen Abbau und ist ein entscheidender Schritt in der Aktivierung von p53 (Chen et al 2005). Diese Phosphorylierung erfolgt nicht nur in Abhängigkeit von ATM, sondern zusätzlich in Abhängigkeit einer nicht identifizierten Kinase, die mit dem Kinase-Inhibitor Wortmannin inhibiert werden kann (Meulmeester et al 2005, Chen et al 2005). Tatsächlich weist die Abhängigkeitsmatrix die Kinase ATR als einen Ambivalenzfaktor (gelbes Matricelement) für MDMX aus (Abb. 4.2). Somit gibt es im Modell einen Signalweg, der von ATR zur Inaktivierung von MDMX führt. Wie aus Abb. 4.1 ersichtlich, bewirkt ATR eine Phosphorylierung von Chk2 (Interaktion 19, Wang et al 2006, Helt et al 2005). Phosphoryliertes Chk2 vermittelt wiederum den Abbau von MDMX (Interaktion 28, Chen et al 2005). Während Chk2 nicht durch Wortmannin gehemmt werden kann, wird ATR durch diesen Inhibitor gehemmt (Sarkaria et al 1998). Daher deutet das Modell darauf hin, dass ATR die bislang nicht identifizierte Kinase ist, die wie ATM die Phosphorylierung von MDMX vermittelt.

Bei der DSBs-induzierten Signaltransduktion zur Aktivierung von NF- κ B kommt es zur zytoplasmatischen Translokation von ubiquityniertem NEMO (Interaktion 48, z. B. McCool und Miyamoto 2012). Wie das Modell erstmals zeigt (Abb. 4.1, 4.2), kann der weitere Signaltransduktionsweg zwei unterschiedliche Verläufe nehmen. Während eine dieser Kaskaden über die Phosphorylierung von TAK1 verläuft, führt die andere Kaskade über die Phosphorylierung von ERK1/2. Beide Kaskaden führen schließlich über die Phosphorylierung des IKK-Komplexes zur nukleären Translokation von NF- κ B (p50-p65 und p50-p50) (Interaktionen 75 bzw. 71, z. B. McCool und Miyamoto 2012).

4.4 Dynamik der DNA-Schadens-Antwort

Feed-Forward-Loops (FFLs) und Feedback-Loops (FLs) können wichtige Funktionen in der Dynamik von Signaltransduktionsnetzwerken und in der Verarbeitung von weitergeleiteten Signalen haben (Alon 2007a). Aus diesen Gründen wurden die FFLs des untersuchten Netzwerks identifiziert (Abb. 4.3). Dabei war es wichtig, zwischen FFLs mit logischem UND-Gatter (UND-Verknüpfung) und logischem ODER-Gatter (ODER-Verknüpfung) zu unterscheiden. Ein Beispiel für ein FFL mit einem UND-Gatter stellt die Sumoylierung von IKK ϵ in Abhängigkeit von seiner vorhergehenden Phosphorylierung und der Anwesenheit von PML-P (phosphoryliert an Serin 38) dar (Abb. 4.3A). Im logischen Sinne ist die

Ergebnisse

Komponente IKK ϵ -S-P daher nur dann aktiv, wenn die Komponenten IKK ϵ -P UND PML-P (Serin 38) beide aktiv sind. Ein Beispiel für ein FFL mit einem ODER-Gatter ist die Aktivierung von p53-P durch ATM-P ODER Chk2-P im FFL in Abb. 4.3F.

Kohärente FFLs vom Typ 1 mit UND-Gatter können die Weiterleitung aktivierender Signale („AN“-Signale) verzögern (Mangan und Alon 2003). Solche FFLs sind in Abb. 4.3A–E gezeigt. Dieselbe Funktion können kohärente FFLs des Typs 4 haben (Mangan und Alon 2003). Solche sind in Abb. 4.3S–Ä gezeigt.

Wie ebenfalls von Mangan und Alon (2003) beschrieben, kann die Termination von Signalen („AUS“-Signale) durch kohärente FFLs vom Typ 1 mit ODER-Gatter (Abb. 4.3F–K), kohärente FFLs vom Typ 2 mit UND-Gatter (Abb. 4.3L und M) und durch kohärente FFLs vom Typ 3 (Abb. 4.3N–R) verzögert werden.

Inkohärente FFLs vom Typ 2 können die Weiterleitung von „AUS“-Signalen hingegen beschleunigen (Mangan und Alon 2003). Im bearbeiteten Netzwerk wurde nur ein solcher FFL (Abb. 4.3Ö) gefunden.

Alle identifizierten FFLs außer einem (Abb. 4.3Ö) könnten also die Weiterleitung von „AN“- oder „AUS“-Signalen verzögern. Die meisten dieser FFLs regulieren p53 oder Proteine, die p53 direkt aktivieren. Der FFL in Abb. 4.3A führt zur Aktivierung von IKK ϵ -S-P. Die FFLs in Abb. 4.3Z und Ä leiten Signale zum IKK-Komplex weiter. IKK ϵ -S-P und der IKK-Komplex vermitteln die Aktivierung von NF- κ B. Drei der vier Typen von FFLs, welche die Signalweiterleitung verzögern könnten, treten bei einem Signifikanzwert von $p < 0,01$ häufiger im Netzwerk auf, als in Zufallsnetzwerken zu erwarten wäre. Dies betrifft die kohärenten FFLs vom Typ 1, vom Typ 3 und vom Typ 4. Lediglich für die kohärenten FFLs vom Typ 2 ist die statistische Signifikanz niedriger ($p = 0,09$). Hingegen ist der Signifikanzwert des potentiell die Signalweiterleitung beschleunigenden inkohärenten FFL vom Typ 2 deutlich geringer ($p = 0,16$).

Zusätzlich wurden FLs identifiziert, die im verwendeten logischen Formalismus funktionell sind (Abb. 4.3a–g). Diese sind allesamt negative FLs. Ein funktioneller negativer FL ist eine notwendige Voraussetzung für stabile Oszillationen (Thieffry 2007). Wie im Falle der FFLs enthalten auch die meisten FLs p53 (Abb. 4.3a–f), nur ein FL (Abb. 4.3g) enthält das phosphorylierte NF- κ B-Dimer p50-p65-P. In letzterem FL aktiviert NF- κ B die Expression seines eigenen Inhibitors I κ Ba. Die FLs in Abb. 4.3a–c wurden bereits in computergestützten Analysen und experimentell nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung untersucht (Batchelor et al 2009). Demgegenüber wurden die negativen FLs in Abb. 4.3d–g bislang nicht nach Stimulation mit SSBs- oder DSBs-induzierenden Agenzien beschrieben. Trotz der Bedeutung negativer FLs für die Regulation einiger Proteine des Modells tritt nur ein Typ negativer FLs mit einem Signifikanzwert von $p < 0,01$ häufiger im Netzwerk auf, als in

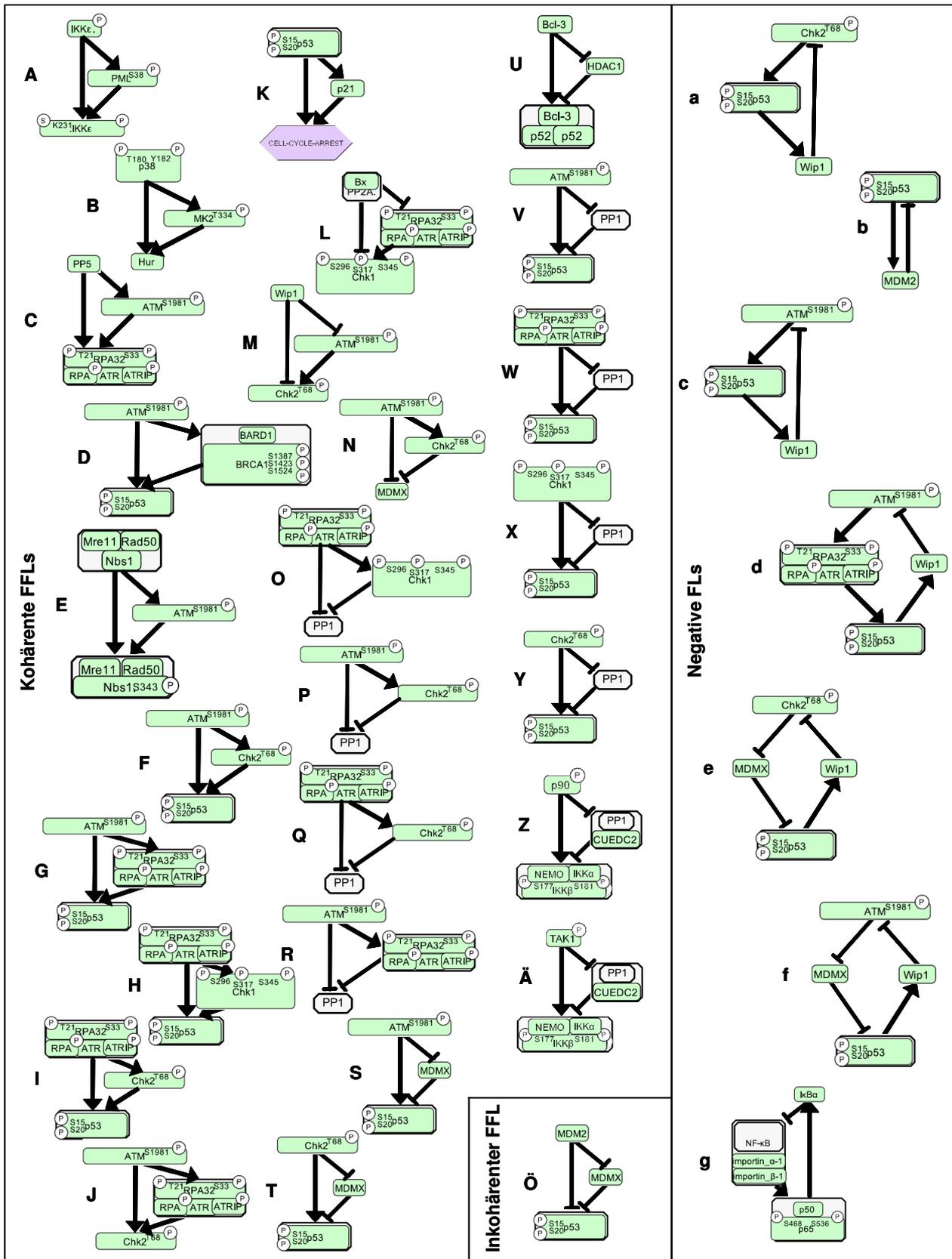


Abb. 4.3 Feed-Forward-Loops (FFLs) und Feedback-Loops (FLs). Identifiziert wurden kohärente FFLs vom Typ 1 mit UND-Gatter (A-E) bzw. ODER-Gatter (F-K), kohärente FFLs vom Typ 2 mit UND-Gatter (L und M), kohärente FFLs vom Typ 3 (N-R), kohärente FFLs vom Typ 4 (S-Ä) und ein inkohärenter FFL vom Typ 2 (Ö). In der rechten Spalte sind negative FLs, die im logischen Modell funktionell sind, gezeigt (a-g).

Ergebnisse

Zufallsnetzwerken zu erwarten wäre. Dies betrifft den negativen FL aus drei aufeinander folgenden Inhibitionen und einer aktivierenden Kante. Dieses Netzwerkmotiv ist im Modell durch zwei funktionelle negative FLs (Abb. 4.3e und f) sowie zwei weitere nicht funktionelle (und daher nicht gezeigte) negative FLs repräsentiert.

Ausgehend von der Tatsache, dass die Anwesenheit eines funktionellen negativen FLs ein notwendiges Kriterium für zyklische Attraktoren darstellt (Thieffry 2007) und aufgrund des Befundes, dass alle identifizierten funktionellen FLs NF- κ B bzw. p53 regulieren, wäre zu erwarten, dass Oszillationen von NF- κ B und p53 mit einem zyklischen Attraktor einhergehen. Zur Untersuchung der Attraktoren des Netzwerks wurde dieses unter Erhalt der Attraktoren auf ein kompaktes Modell reduziert (siehe Material und Methoden). Die regulatorischen Komponenten dieses kompakten Modells beschränken sich auf DSBs early, DSBs late, RPA-ATR-ATRIP-P, ATM-P, p53-P und NF- κ B (p50-p65-P) (Abb. 4.4). Für dynamische Analysen des reduzierten Modells wurden Zustandsübergangsgraphen unter Anwendung eines asynchronen Aktualisierungsschemas mit drei Prioritätsklassen erstellt. Die Einteilung der Zustandsübergänge des Modells in die Prioritätsklassen 1, 2 und 3 entspricht der oben erläuterten Zuordnung der Interaktionen zu den Zeitskalenwerten 1, 2 und 3. Folglich wurden der Prioritätsklasse 1 die frühesten Zustandsübergänge zugeteilt; dies sind solche, die mit der Aktivierung von RPA-ATR-ATRIP-P, ATM-P, p53-P oder NF- κ B einhergehen. Die Prioritätsklasse 2 wird durch Zustandsübergänge gebildet, in denen die Aktivierung von DSBs late durch DSBs early erfolgt. Die Prioritätsklasse 3 bilden Zustandsübergänge, die einer Inaktivierung von Signalwegen entsprechen, die also mit Verminderungen der Aktivität von RPA-ATR-ATRIP-P, ATM-P, p53-P oder NF- κ B einhergehen, wie etwa der Senkung des Wertes der Zustandsvariablen von ATM-P von ‚2‘ auf ‚1‘.

Nach Induktion von DSBs trat das reduzierte Netzwerk (Abb. 4.4A) in einen Attraktor vom Typ der komplexen Schleifen ein (Abb. 4.4a). Im nächsten Schritt wurde die Bedeutung der funktionellen FLs (Abb. 4.3a-g) für diesen zyklischen Attraktor eingehender untersucht. Dazu wurden im Modell Mutationen eingeführt, die zur Inaktivierung der identifizierten FLs führen. Bei konstitutiver Aktivität von NF- κ B (Abb. 4.4B) oder Inaktivität von p53-P (Abb. 4.4C) trat das Netzwerk auch in einen zyklischen Attraktor vom Typ der komplexen bzw. einfachen Schleifen ein (Abb. 4.4b bzw. c). Letzteres gilt auch für das Modell mit inaktivem NF- κ B (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber nahm das Netzwerk, in dem sowohl NF- κ B konstitutiv aktiv als auch p53-P inaktiv ist, einen logischen stationären Zustand ein. Dieser ist in Abb. 4.4d mit einer Ellipse markiert. Auch eine konstitutive Aktivität von p53-P war hinreichend, um das Netzwerk in einen logischen stationären Zustand zu lenken (Abb. 4.4e).

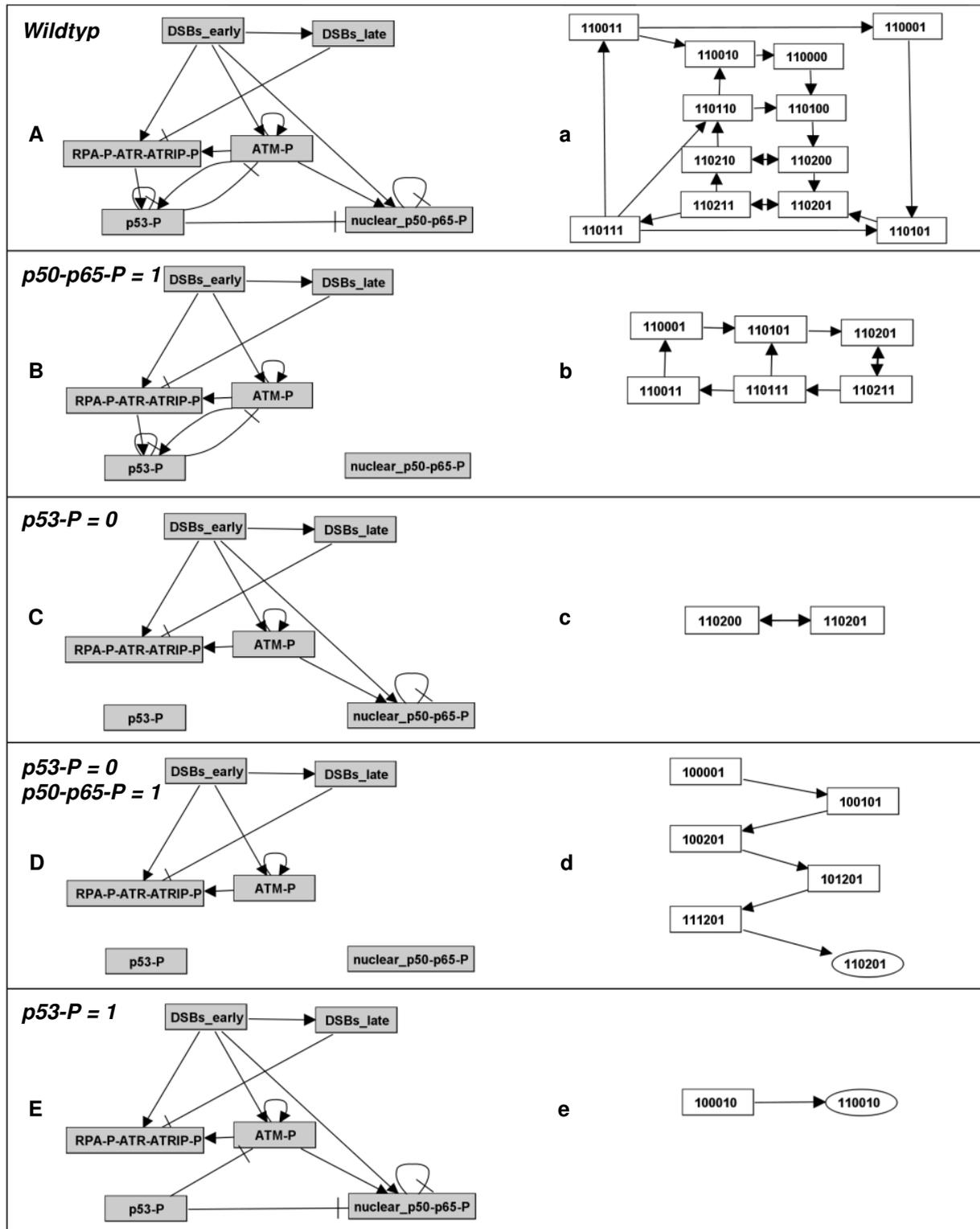


Abb. 4.4 Abhängigkeit der Dynamik der DNA-Schadens-Antwort von p53 und NF-κB. A-E zeigen Interaktionsgraphen, die dem reduzierten Modell unterliegen, das nur die regulatorischen Komponenten DSBs early, DSBs late, RPA-P-ATR-ATRIP-P, ATM-P, p53-P und nuclear p50-p65-P umfasst. Gezeigt sind die Interaktionsgraphen des Wildtyps (A) sowie der Varianten mit konstitutiv aktivem p50-p65-P (B), p53-Defizienz (C), p53-Defizienz und konstitutiv aktivem p50-p65-P (D) sowie konstitutiv aktivem p53-P (E). Das dynamische Verhalten der Netzwerke A-E nach Induktion von DSBs illustrieren die Zustandsübergangsgraphen a-e. Deren Knoten geben die Aktivitätszustände von DSBs early (erste Ziffer), DSBs late (zweite Ziffer), RPA-P-ATR-ATRIP-P (dritte Ziffer), ATM-P (vierte Ziffer), p53-P (fünfte Ziffer) und nuclear p50-p65-P (sechste Ziffer) wieder. Während die Zustandsübergangsgraphen a-c der Übersicht halber auf die Attraktoren beschränkt sind, geben die Zustandsübergangsgraphen d und e alle berechneten Zustandsübergänge wieder, wobei Ellipsen logische stationäre Zustände symbolisieren.

Ergebnisse

Obgleich für jeden Attraktor eines detaillierten Modells (d. h. vor der Netzwerkreduktion) ein Gegenstück in der reduzierten Version desselben Modells existiert, kann eine Reduktion des Netzwerks zum Verlust von Trajektorien im Zustandsübergangsgraphen führen. Folglich hat nicht jede Trajektorie eines detaillierten Modells ein Gegenstück im Zustandsübergangsgraphen des reduzierten Modells. Dies kann Veränderungen der Art und Anzahl von Attraktoren im Zuge der Reduktion mit sich bringen (Naldi et al 2011). Um derartige Veränderungen auszuschließen, wurde geprüft, ob alle identifizierten Attraktoren (Abb. 4a-e) des reduzierten Modells (Abb. 4A) und seiner modifizierten Formen (Abb. 4B-E) den Attraktoren des detaillierten Modells und seiner modifizierten Varianten entsprechen. Dazu wurden die logischen stationären Zustände der detaillierten Netzwerkvarianten identifiziert (Anhang 3). Für die Identifizierung zyklischer Attraktoren war der Zustandsraum des detaillierten Modells hingegen zu groß. Dennoch ließen sich zyklische Attraktoren indirekt identifizieren, da alle Attraktoren entweder zyklische Attraktoren oder logische stationäre Zustände darstellen (Thieffry 2007). Somit deutet das Fehlen logischer stationärer Zustände eines Netzwerks auf die Anwesenheit mindestens eines zyklischen Attraktors hin. Die Identifizierung der logischen stationären Zustände der detaillierten Modellvarianten erforderte keine Spezifizierung von Prioritätsklassen, da logische stationäre Zustände vom Aktualisierungsschema - und damit von Prioritätsklassen - unabhängig sind (Albert und Wang 2009). Nach Induktion von DSBs trat das detaillierte Wildtyp-Netzwerk in keinen logischen stationären Zustand ein (Anhang 3, Spalte A). Das Gleiche gilt für die detaillierten Netzwerkvarianten mit konstitutiv aktivem NF- κ B (Anhang 3, Spalte B) oder konstitutiv inaktivem p53-P (Anhang 3, Spalte C). Daraus folgt, dass diese detaillierten Netzwerkvarianten wie die korrespondierenden reduzierten Varianten (Abb. 4a-c) nach Induktion von DSBs in zyklische Attraktoren eintraten. Demgegenüber trat die detaillierte Netzwerkvariante mit konstitutiv inaktivem p53-P und aktivem NF- κ B ebenso wie die Variante mit konstitutiv aktivem p53-P in einen logischen stationären Zustand ein (Anhang 3, Spalten D und E). Diese Attraktoren entsprechen den logischen stationären Zuständen der zugehörigen reduzierten Netzwerkvarianten (Abb. 4d und e). Keine der detaillierten Modellvarianten enthält einen funktionellen positiven FL (Daten nicht gezeigt). Daher ist eine notwendige Voraussetzung für Bi- oder Multistabilität nicht erfüllt. Demzufolge enthalten alle detaillierten Modellvarianten wie die zugehörigen reduzierten Varianten nur jeweils einen Attraktor. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Attraktoren der reduzierten Modellvarianten jenen der detaillierten Modellvarianten entsprechen.

4.5 Potentielle Zielproteine zur Sensibilisierung von Karzinomen

Zur Identifizierung potentieller Zielmoleküle zur Sensibilisierung von Karzinomen wurde die Behandlung mit Substanzen simuliert, die SSBs (z. B. TOP1-Inhibitoren) oder nur DSBs (z.B.

Tab. 4.2 Potentielle Zielproteine zur Sensibilisierung von Karzinomen

Dysfunktionales Protein im Tumor	Mögliche Zielproteine zur Potenzierung der Zytotoxizität von	
	DNA-SSBs	DNA-DSBs
p53	ATM-P & ATR ATM-P & Chk1-P & Chk2-P ATM-P & Chk2-P & c-Rel ATM-P & Chk2-P & IKK_complex-P ATR & Chk2-P & FKBP51 * ATR & Chk2-P & IKK_complex-P * ATR & Chk2-P & IKKε-P * ATR & Chk2-P & p50-p65-P * ATR & MRN Chk1-P & Chk2-P & MRN Chk2-P & c-Rel & MRN Chk2-P & IKK_complex-P & LUBAC * Chk2-P & IKK_complex-P & MK2-P * Chk2-P & IKK_complex-P & MRN Chk2-P & IKK_complex-P & TAK1-P * Chk2-P & IKK_complex-P & TRAF6 * Chk2-P & IKK_complex-P & XIAP * PP5	ATM-P ATR & Chk2-P & FKBP51 * ATR & Chk2-P & IKK_complex-P * ATR & Chk2-P & IKKε-P * ATR & Chk2-P & p50-p65-P * Chk2-P & IKK_complex-P & LUBAC * Chk2-P & IKK_complex-P & MK2-P * Chk2-P & IKK_complex-P & TAK1-P * Chk2-P & IKK_complex-P & TRAF6 * Chk2-P & IKK_complex-P & XIAP * MRN PP5
HIPK2	ATM-P & ATR ATM-P & Chk1-P & Chk2-P ATM-P & Chk2-P & c-Rel ATM-P & Chk2-P & IKK_complex-P ATR & MRN Chk1-P & Chk2-P & MRN Chk2-P & c-Rel & MRN Chk2-P & IKK_complex-P & MRN PP5	ATM-P MRN PP5
ATM	ATR * Chk1-P & Chk2-P * Chk2-P & c-Rel * Chk2-P & IKK_complex-P * PP5	Keine Zielproteine gefunden.
Chk2	ATM-P & ATR ATM-P & Chk1-P * ATM-P & c-Rel * ATM-P & IKK_complex-P * ATR & BARD1-BRCA1-P & FKBP51 * ATR & BARD1-BRCA1-P & IKK_complex-P * ATR & BARD1-BRCA1-P & IKKε-P * ATR & BARD1-BRCA1-P & p50-p65-P * ATR & FKBP51 & p53-P * ATR & IKK_complex-P & p53-P * ATR & IKKε-P & p53-P * ATR & MRN ATR & p50-p65-P & p53-P * Chk1-P & MRN * c-Rel & MRN * IKK_complex-P & LUBAC & p53-P * IKK_complex-P & MK2-P & p53-P * IKK_complex-P & MRN * IKK_complex-P & p53-P & TAK1-P * IKK_complex-P & p53-P & TRAF6 * IKK_complex-P & p53-P & XIAP * PP5	ATM-P ATR & BARD1-BRCA1-P & FKBP51 * ATR & BARD1-BRCA1-P & IKK_complex-P * ATR & BARD1-BRCA1-P & IKKε-P * ATR & BARD1-BRCA1-P & p50-p65-P * ATR & FKBP51 & p53-P * ATR & IKK_complex-P & p53-P * ATR & IKKε-P & p53-P * ATR & p53-P & p50-p65-P * IKK_complex-P & LUBAC & p53-P * IKK_complex-P & MK2-P & p53-P * IKK_complex-P & p53-P & TAK1-P * IKK_complex-P & p53-P & TRAF6 * IKK_complex-P & p53-P & XIAP * MRN PP5

* Gruppen von Zielproteinen, für deren Inhibition eine selektive Sensibilisierung von Karzinomzellen mit dem jeweiligen molekularen Defekt potenziert wird, während normale Zellen durch Zellzyklus-Arrest und DNA-Reparatur überleben könnten.

Ergebnisse

TOP2-Inhibitoren) verursachen. Da p53, HIPK2, ATM oder Chk2 in epithelialen Tumorzellen infolge von Mutationen in den sie kodierenden Genen häufig inaktiv sind (Schuijjer et al 2003, Sombroek und Hofmann 2009, Ding et al 2008, Meijers-Heijboer et al 2002), wurde die DNA-Schadens-Antwort nach Inaktivierung jeweils eines dieser Proteine simuliert. Um die Signaltransduktion nach Induktion von SSBs oder DSBs, aber vor dem Eintritt von Feedback-Inhibitionen zu simulieren, wurde der Zeitskalenwert 2 gewählt. Darauf basierend wurden Minimal Intervention Sets von Zielproteinen errechnet, deren Inhibition eine Sensibilisierung von Karzinomen auf dreifache Weise bewirken könnte: (i) Blockade des Zellzyklus-Arrest und (ii) Blockade der Aktivierung von anti-apoptotischem NF- κ B, bei (iii) Beibehaltung mindestens eines intakten Signalwegs zur Aktivierung von ‚ONSET OF APOPTOSIS‘. In Gegenwart von (therapeutisch induzierten) Schäden der DNA würde die Erfüllung des Ziels (i) zur Eliminierung von Karzinomzellen durch Einleitung von mitotischer Katastrophe führen (Portugal et al 2010). Die zusätzliche Erfüllung der Ziele (ii) und (iii) würde darüber hinaus die Apoptose fördern.

Es wurden 85 Gruppen potentieller Zielproteine zur Sensibilisierung von Karzinomzellen für Therapien identifiziert, in denen SSBs bzw. DSBs induziert werden (Tab. 4.2). Zusätzlich wurden Gruppen von Molekülen gefunden, die therapeutisch weniger geeignete Zielproteine (Anhang 4) enthalten. ATM-Defizienz erfüllte bereits die Interventionsziele in Anwesenheit von DSBs. Folglich wurden für ATM-defiziente Zellen keine Zielmoleküle zur Sensibilisierung für DSBs-induzierende Therapien gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten zahlreicher Studien überein, in denen gezeigt wurde, dass Zellen durch Inhibition von ATM für DSBs-induzierende Therapeutika sensibilisiert werden können (Tofilon und Camphausen 2009). Entsprechend weisen aus Patienten des Louis-Bar-Syndroms (dysfunktionelles ATM) isolierte Zellen eine erhöhte Sensibilität für ionisierende Strahlung (Radiosensibilität) auf (Lavin 2008). Die in Tab. 4.2 mit Sternen markierten Gruppen von Zielproteinen sind den Ergebnissen zufolge geeignet, um nur in Karzinomzellen mit der jeweiligen Mutation alle Signalwege zum Überleben der Zelle zu blockieren. Demgegenüber könnten normale Zellen bei Inhibition dieser Zielproteine durch Zellzyklus-Arrest und nachfolgende DNA-Reparatur überleben. Diese Zielproteine sind daher potentiell geeignet, um selektiv Karzinomzellen mit dem jeweils spezifizierten molekularen Defekt zu sensibilisieren. Somit sind die mit Sternen gekennzeichneten Gruppen von Zielproteinen therapeutisch potentiell am wirksamsten.

4.6 Simulationen der DNA-Schadens-Antwort bei Erbkrankheiten

Zur Untersuchung, in welcher Weise einige Erbkrankheiten die DNA-Schadens-Antwort beeinträchtigen, wurde im Modell jeweils ein Protein inaktiviert, dessen Dysfunktion eine gegebene Erbkrankheit bewirkt. Zudem wurden die Komponenten SSBs und DSBs early gleichzeitig aktiviert und anschließend der logische stationäre Zustand des Netzwerks zu

Ergebnisse

einem definierten Zeitskalenwert ermittelt. Sofern nicht anders angegeben, wurde der Zeitskalenwert 2 gewählt, um die Signaltransduktion vor dem Einsetzen von Feedbackmechanismen zu untersuchen. Hingegen wurde zur Untersuchung der veränderten Feedbackmechanismen der logische stationäre Zustand zum Zeitskalenwert 3 ermittelt. Die *in silico* erhobenen Ergebnisse wurden mit Literaturdaten verglichen (Tab. 4.3).

Das durch Fehlen von funktionellem ATM ausgelöste Louis-Bar-Syndrom wurde in früheren Studien mit Defekten sowohl in der Aktivierung von p53 als auch in der Aktivierung von Zellzyklus-Arrest an den G1/S-, Intra-S- und G2/S-Zellzyklus-Kontrollpunkten assoziiert. Daneben sind chromosomale Instabilität, erhöhte Radiosensibilität sowie eine Prädisposition

Tab. 4.3 Simulationen der DNA-Schadens-Antwort bei Erbkrankheiten

Erbkrankheit	Molekulare Ursache	Berichtete Defekte	Referenzen	<i>In-silico</i>-Prädiktionen
Louis-Bar-Syndrom	ATM defekt	<u>molekulare Defekte</u> <ul style="list-style-type: none"> Aktivierung von p53 blockiert <u>zelluläre Defekte</u> <ul style="list-style-type: none"> alle Zellzyklus-Kontrollpunkte defekt chromosomale Instabilität Radiosensibilität erhöht <u>klinische Symptome</u> <ul style="list-style-type: none"> Inzidenz von Lymphoid-Tumoren erhöht 	Jorgensen und Shiloh 1996 Lavin 2008	<ul style="list-style-type: none"> Aktivierung von p53 blockiert Hemmung der Apoptose durch p50-p65-P blockiert Zellzyklus-Arrest vermindert Unterbrechung einiger negativer FLs, die Signaltransduktionswege deaktivieren
Ataxia telangiectasia-like-Disorder	Mre11 defekt	<u>zelluläre Defekte</u> <ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest vermindert chromosomale Instabilität Radiosensibilität erhöht 	Lavin 2008	<ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest vermindert Unterbrechung einiger negativer FLs, die Signaltransduktionswege deaktivieren
Nijmegen-Breakage-Syndrom	Nbs1 defekt	<u>molekulare Defekte</u> <ul style="list-style-type: none"> Aktivität von ATR reduziert Expression von p21 reduziert <u>zelluläre Defekte</u> <ul style="list-style-type: none"> alle Zellzyklus-Kontrollpunkte defekt erhöhte Sensibilität gegenüber DSBs-induzierenden Agenzien DNA-Reparatur vermindert <u>klinische Symptome</u> <ul style="list-style-type: none"> Inzidenz von Lymphoid-Tumoren erhöht 	Antocchia et al 2006 Lavin 2008	<ul style="list-style-type: none"> ATM-abhängige Aktivierung von ATR blockiert Expression von p21 blockiert Zellzyklus-Arrest vermindert Phosphorylierung von BRCA1 unterbrochen Unterbrechung einiger negativer FLs, die Signaltransduktionswege deaktivieren
Nijmegen-Breakage-Syndrom-like-Disorder	Rad50 defekt	<u>zelluläre Defekte</u> <ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest vermindert chromosomale Instabilität Radiosensibilität erhöht 	Barbi et al 1991 Waltes et al 2009	<ul style="list-style-type: none"> Zellzyklus-Arrest vermindert Unterbrechung einiger negativer FLs, die Signaltransduktionswege deaktivieren
ATR-Seckel-Syndrom	Konzentration von ATR vermindert	<u>molekulare Defekte</u> <ul style="list-style-type: none"> Phosphorylierungen von Chk1 und p53 durch ATR reduziert durch ionisierende Strahlung induzierte ATM-abhängige Signaltransduktion intakt 	O'Driscoll et al 2004	<ul style="list-style-type: none"> ATR-abhängige Aktivierung von p53 und Chk1 blockiert durch ionisierende Strahlung induzierte ATM-abhängige Signaltransduktion intakt Zellzyklus-Arrest vermindert

Ergebnisse

für Lymphoidtumore (Tumore des Lymphsystems) für das Louis-Bar-Syndrom charakteristisch (Jorgensen und Shiloh 1996, Lavin 2008). Im Modell führte ATM-Defizienz zur Hemmung der Aktivierung von p53 und dessen Zielgen p21. Entsprechend konnten p53 und p21 keinen Zellzyklus-Arrest mehr bewirken. Darüber hinaus wurde c-Myc nun exprimiert, also war die zum Zellzyklus-Arrest führende Hemmung von c-Myc aufgehoben. Tatsächlich tragen Defekte in der Aktivierung des Zellzyklus-Arrests zu chromosomaler Instabilität bei, die wiederum zum Zelltod durch mitotische Katastrophe führt (Portugal et al 2010) und die Karzinogenese fördern kann (Jackson und Bartek 2009). Die unterbrochene Aktivierung von NF- κ B (p50-p65-P) im Modell könnte zum verstärkten Zelltod durch Apoptose beitragen, obgleich die durch p53 vermittelte Apoptose ebenfalls durch ATM-Defizienz gehemmt war. Der gehemmten Aktivierung von NF- κ B und p53 entsprechend waren auch die funktionellen FLs (Abb. 4.3a-g) nicht mehr aktiv.

Das Syndrom Ataxia telangiectasia-like-Disorder (defektes Mre11) geht ebenfalls mit Defekten in der Aktivierung von Zellzyklus-Arrest, chromosomaler Instabilität und erhöhter Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung einher (Lavin 2008). Da Mre11 im Modell nur als Untereinheit des MRN-Komplexes fungiert, dessen Funktion wiederum die Aktivierung von ATM ist, waren die gehemmten Signaltransduktionswege im Modell mit denen des Louis-Bar-Syndroms identisch.

Letzteres gilt auch für das Nijmegen-Breakage-Syndrom (Nbs1 defekt) (Antocchia et al 2006, Lavin 2008), da Nbs1 im Modell ebenfalls nur als Untereinheit des MRN-Komplexes vorkommt. Das Nijmegen-Breakage-Syndrom geht zudem mit verminderter Reparatur der DNA einher (Antocchia et al 2006, Lavin 2008). Wie oben erwähnt, fördert der Zellzyklus-Arrest in der DNA-Schadens-Antwort die Reparatur der DNA, da er vielen Reparaturmechanismen die erforderliche Zeit verschafft. Entsprechend könnte die im Modell durch Nbs1-Defizienz bewirkte Hemmung von Signalwegen zum Zellzyklus-Arrest (Phosphorylierung von p53 an Serin 15 oder 20, Expression von p21, Hemmung der Expression von c-Myc) zur Minderung von Kapazitäten der DNA-Reparatur beitragen. Zudem war die ATM-abhängige Phosphorylierung von BRCA1 in der Simulation gehemmt. Auch dieser Effekt könnte zur Verminderung der DNA-Reparatur beitragen, da BRCA1 in der Beseitigung von DSBs durch homologe Rekombination eine essentielle Rolle spielt (Ciccia und Elledge 2010).

Nijmegen-Breakage-Syndrome-like-Disorder (Barbi et al 1991, Waltes et al 2009) wird durch Mutationen des Gens, das für Rad50 kodiert ausgelöst. Auch dieses Protein fungiert im Modell ausschließlich als Untereinheit des MRN-Komplexes und damit nur in der Aktivierung von ATM. Folglich waren die beeinträchtigten Signalwege im Modell auch hier dieselben wie im Falle des Louis-Bar-Syndroms.

Ergebnisse

Das ATR-Seckel-Syndrom wird durch eine verminderte Proteinkonzentration von ATR ausgelöst. Die Phosphorylierungen von Chk1 und p53 sind reduziert, während die durch ionisierende Strahlung ausgelöste ATM-abhängige Signaltransduktion intakt ist. Die Zellen zeigen keine ausgeprägte Radiosensibilität oder Prädisposition für Krebserkrankungen (O'Driscoll et al 2004). Im Einklang mit diesen Literaturangaben beeinträchtigte die Defizienz von ATR in der Simulation nicht die ATM-abhängige Signaltransduktion in Reaktion auf ionisierende Strahlung. Demgegenüber war die Anzahl der Signalwege zur Phosphorylierung von Chk1 und p53 vermindert. Zudem führte ATR-Defizienz im Modell zur Hemmung von zwei Signalwegen zum Zellzyklus-Arrest, die durch Expression von p21 bzw. Hemmung der Expression von c-Myc vermittelt werden.

4.7 Molekulare Defekte, die potentiell zur Karzinogenese beitragen

Defekte der DNA-Schadens-Antwort, die das Vermögen der Zelle zum Eintritt in die Apoptose oder in den Zellzyklus-Arrest mindern, tragen zur Karzinogenese bei, da solche Defekte die unkontrollierte Proliferation der Zelle fördern (Jackson und Bartek 2009). Um derartige potentiell relevante Fehlfunktionen zu identifizieren, wurde die DNA-Schadens-Antwort nach simultaner Induktion von SSBs und DSBs zum Zeitskalenwert 2 analysiert. Durch Errechnung von Minimal Intervention Sets wurden Kombinationen molekularer Defekte (konstitutive Aktivierungen oder Inaktivierungen) identifiziert, die zur Hemmung beider Komponenten der Ausgangs-Ebene (CELL CYCLE ARREST und ONSET OF APOPTOSIS) führten. Nicht berücksichtigt wurden in der Analyse Kombinationen mit molekularen Defekten, die gemäß Literaturdaten einer unkontrollierten Proliferation der Zelle entgegenwirken (Anhang 5). Damit wurde Proteinfunktionen Rechnung getragen, die für die Karzinogenese relevant, aber nicht im Modell integriert sind.

Es wurden 117 Kombinationen molekularer Defekte gefunden, die potentiell zur Karzinogenese beitragen, indem sie der Zelle trotz geschädigter DNA eine fortlaufende Teilung und die Umgehung der Apoptose ermöglichen (Tab. 4.4). In der Tabelle steht [0] für konstitutive Inaktivität, während [1] bzw. [2] für den konstitutiven Aktivitätszustand ‚1‘ bzw. ‚2‘ steht. Beispielsweise kann die Karzinogenese den Ergebnissen zufolge durch den Verlust oder eine konstitutive Inaktivität von I κ B α oder des IKK-Komplexes gefördert werden, wie etwa die Kombinationen 2 bzw. 13 zeigen. Alternativ dazu könnte eine konstitutiv hohe Proteinkonzentration bzw. Aktivität (Aktivitätszustand ‚2‘) von I κ B α oder des IKK-Komplexes die Karzinogenese fördern, wie beispielsweise die Kombinationen 110 respektive 6 zeigen.

Ergebnisse

Tab. 4.4 Kombinationen konstitutiver Aktivitäten und Inaktivitäten, die potentiell die Karzinogenese fördern

Nr.	Potentiell die Karzinogenese fördernde molekulare Defekte	Potentiell die Karzinogenese fördernde molekulare Defekte
1	[0]PP5 & [0]PIDD-RAIDD-caspase2	[0]MRN & [1]TAK1-P
2	[0]PP5 & [0]kappaBalpha	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P
3	[0]PP5 & [0]PIDD	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
4	[0]PP5 & [0]Hsp90	[1]Wip1 & [1]Cdk2
5	[0]PP5 & [1]p90-P	[1]Wip1 & [1]PP2A-B55
6	[0]PP5 & [2]IKK_complex-P	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
7	[0]PP5 & [1]MEK-P	[1]Wip1 & [0]PIDD
8	[0]PP5 & [1]ERK-P	[1]Wip1 & [1]nuclear_p50-p65-P
9	[0]PP5 & [1]cytosolic_p50-p65	[1]Wip1 & [0]Hsp90
10	[0]PP5 & [1]nuclear_p50-p65-P	[0]FHIT & [1]PP2A-Bx
11	[0]PP5 & [1]TAK1-P	[0]FHIT & [1]PP2A-Bx
12	[1]Wip1 & [0]Hsp90	[1]Wip1 & [0]PIDD
13	[1]Wip1 & [0]IKK_complex-P	[1]Wip1 & [0]PIDD
14	[1]Wip1 & [0]PIDD	[1]Wip1 & [0]PIDD
15	[1]Wip1 & [0]IKK_complex-P	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
16	[1]Wip1 & [0]IKK_complex-P	[1]Wip1 & [0]PIDD
17	[0]ATM-P & [0]Hsp90	[1]Wip1 & [1]MDMX
18	[0]ATM-P & [1]PP2A-Bx	[0]FHIT & [1]MDMX2
19	[0]ATM-P & [1]PP2A-Bx	[0]FHIT & [0]Hsp90
20	[0]PIDD & [0]ATM-P	[1]PP1 & [0]FHIT
21	[0]FHIT & [0]ATM-P	[0]Hsp90 & [1]PP2A-Bx
22	[0]ATM-P & [0]Hsp90	[0]FHIT & [1]MDMX
23	[1]p90-P & [0]ATM-P	[0]FHIT & [1]MDMX
24	[0]ATM-P & [1]PP2A-Bx	[1]PP1 & [0]FHIT
25	[0]ATM-P & [1]MEK-P	[1]Wip1 & [1]p90-P
26	[0]ATM-P & [1]ERK-P	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P
27	[0]ATM-P & [1]cytosolic_p50-p65	[1]Wip1 & [1]MEK-P
28	[0]ATM-P & [1]nuclear_p50-p65-P	[1]Wip1 & [1]ERK-P
29	[0]ATM-P & [1]TAK1-P	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P
30	[0]Chk2-P & [0]BARD1-BRCA1-P	[1]Wip1 & [1]nuclear_p50-p65-P
31	[0]MRN & [0]Hsp90	[1]Wip1 & [1]p90-P
32	[0]Hsp90 & [0]Chk2-P	[1]Wip1 & [1]Cdk2
33	[0]Chk2-P & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]p90-P
34	[1]MDMX & [0]Hsp90	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
35	[0]Hsp90 & [0]Chk2-P	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
36	[0]Hsp90 & [0]Chk2-P	[1]Wip1 & [1]Cdk2
37	[1]PP1 & [0]Chk2-P	[1]Wip1 & [1]PP2A-B55
38	[1]MDMX & [0]Chk2-P	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
39	[1]MDMX & [0]Chk2-P	[1]Wip1 & [1]MEK-P
40	[1]PP1 & [0]Chk2-P	[1]Wip1 & [1]ERK-P
41	[0]MRN & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
42	[1]Wip1 & [0]PIDD-RAIDD-caspase2	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
43	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P	[1]Wip1 & [1]nuclear_p50-p65-P
44	[1]Wip1 & [1]Cdc25A	[1]Wip1 & [1]MEK-P
45	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]ERK-P
46	[1]Wip1 & [2]kappaBalpha	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
47	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
48	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]Cdk2
49	[0]FHIT & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]Cdk2
50	[0]MRN & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]MEK-P
51	[0]MRN & [0]PIDD	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
52	[0]MRN & [0]FHIT	[1]Wip1 & [1]ERK-P
53	[0]MRN & [0]Hsp90	[1]Wip1 & [1]ERK-P
54	[0]MRN & [1]p90-P	[1]Wip1 & [2]kappaBalpha
55	[0]MRN & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [2]kappaBalpha
56	[0]MRN & [1]MEK-P	[1]Wip1 & [1]PP2A-B55
57	[0]MRN & [1]ERK-P	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
58	[0]MRN & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]PP2A-B55
59	[0]MRN & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]TAK1-P
60	[0]MRN & [1]TAK1-P	[1]Wip1 & [1]TAK1-P
61	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P
62	[1]Wip1 & [1]Cdc25A	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
63	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
64	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55	[1]Wip1 & [1]PP2A-B55
65	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
66	[1]Wip1 & [0]PIDD	[1]Wip1 & [0]PIDD
67	[1]Wip1 & [1]nuclear_p50-p65-P	[1]Wip1 & [1]nuclear_p50-p65-P
68	[0]FHIT & [0]Hsp90	[0]FHIT & [0]Hsp90
69	[0]FHIT & [1]PP2A-Bx	[0]FHIT & [1]PP2A-Bx
70	[1]Wip1 & [0]PIDD	[0]FHIT & [0]PIDD
71	[1]Wip1 & [0]PIDD	[1]Wip1 & [0]PIDD
72	[1]Wip1 & [0]PIDD	[1]Wip1 & [0]PIDD
73	[1]Wip1 & [0]PIDD	[1]Wip1 & [0]PIDD
74	[0]PIDD & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
75	[1]Wip1 & [0]PIDD	[1]Wip1 & [0]PIDD
76	[0]FHIT & [1]MDMX	[1]Wip1 & [1]MDMX
77	[0]FHIT & [1]MDMX2	[0]FHIT & [1]MDMX2
78	[0]FHIT & [0]Hsp90	[0]FHIT & [0]Hsp90
79	[1]PP1 & [0]FHIT	[1]PP1 & [0]FHIT
80	[0]Hsp90 & [1]PP2A-Bx	[0]Hsp90 & [1]PP2A-Bx
81	[0]FHIT & [1]MDMX	[0]FHIT & [1]MDMX
82	[0]FHIT & [1]MDMX	[0]FHIT & [1]MDMX
83	[1]PP1 & [0]FHIT	[1]PP1 & [0]FHIT
84	[1]Wip1 & [1]p90-P	[1]Wip1 & [1]p90-P
85	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P
86	[1]Wip1 & [1]MEK-P	[1]Wip1 & [1]MEK-P
87	[1]Wip1 & [1]ERK-P	[1]Wip1 & [1]ERK-P
88	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P	[1]Wip1 & [0]ciaspin-P
89	[1]Wip1 & [1]nuclear_p50-p65-P	[1]Wip1 & [1]nuclear_p50-p65-P
90	[1]Wip1 & [1]p90-P	[1]Wip1 & [1]p90-P
91	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
92	[1]p90-P & [1]PP2A-Bx	[1]p90-P & [1]PP2A-Bx
93	[1]Wip1 & [1]p90-P	[1]Wip1 & [1]p90-P
94	[1]Wip1 & [1]Cdc25A	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
95	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
96	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55
97	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
98	[1]Wip1 & [1]MEK-P	[1]Wip1 & [1]MEK-P
99	[1]Wip1 & [1]ERK-P	[1]Wip1 & [1]ERK-P
100	[1]Wip1 & [1]Cdc25A	[1]Wip1 & [1]Cdc25A
101	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
102	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
103	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
104	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
105	[1]Wip1 & [1]Cdk2	[1]Wip1 & [1]Cdk2
106	[1]MEK-P & [1]PP2A-Bx	[1]MEK-P & [1]PP2A-Bx
107	[1]Wip1 & [1]MEK-P	[1]Wip1 & [1]MEK-P
108	[1]ERK-P & [1]PP2A-Bx	[1]ERK-P & [1]PP2A-Bx
109	[1]Wip1 & [1]ERK-P	[1]Wip1 & [1]ERK-P
110	[1]Wip1 & [2]kappaBalpha	[1]Wip1 & [2]kappaBalpha
111	[1]Wip1 & [2]kappaBalpha	[1]Wip1 & [2]kappaBalpha
112	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55
113	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
114	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55	[1]PP2A-Bx & [1]PP2A-B55
115	[1]TAK1-P & [1]PP2A-Bx	[1]TAK1-P & [1]PP2A-Bx
116	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx	[1]Wip1 & [1]PP2A-Bx
117	[1]Wip1 & [1]TAK1-P	[1]Wip1 & [1]TAK1-P

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Literatur-basiertes logisches Modell der von DNA-Strangbrüchen induzierten Signaltransduktion humaner Epithelzellen erstellt und analysiert. Das Modell gibt funktionelle Beziehungen zahlreicher Signaltransduktionswege wieder, die entweder zur Apoptose oder zum Überleben der Zelle führen, wobei letzteres über die Induktion von Zellzyklus-Arrest oder die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt. Anhand der Reproduktion einer Vielzahl von Literaturdaten, die in Untersuchungen von Epithelzellen erhoben wurden, erfolgte die Validierung des Modells. Das Netzwerk stellt das bisher größte Modell der DNA-Schadens-Antwort menschlicher Zellen dar.

Kürzlich wurde mithilfe eines der bisher größten Modelle der DNA-Schadens-Antwort die Induktion von temporärem Zellzyklus-Arrest und Apoptose in U2OS-Osteosarkom-Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin analysiert. Das 35 Proteine umfassende Modell wurde computergestützt analysiert. Die Zellen wurden einer für viele Tumore typischen Konzentration von TNF- α ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α die Zahl der apoptotischen Zellen nach Behandlung mit Doxorubicin synergistisch erhöht. Zumindest in U2OS-Zellen spielt ERK1/2 eine pro-apoptotische Rolle, während in einigen anderen Zelllinien eine anti-apoptotische Wirkung von ERK1/2 beobachtet wurde (Tentner et al 2012).

5.1 Regulation der DNA-Schadens-Antwort und ihre Dynamik

Einen globalen und umfassenden Überblick über funktionelle Abhängigkeiten zwischen den regulatorischen Komponenten des Netzwerks und Wechselwirkungen zwischen Signalwegen gibt die Abhängigkeitsmatrix (Abb. 4.2). So konnte mithilfe der Abhängigkeitsmatrix eine hemmende Wirkung der pro-apoptotischen Form von p53 auf NF- κ B vorhergesagt werden. Eine antagonistische Wechselbeziehung zwischen p53 auf NF- κ B wurde bereits beschrieben. Zurückgeführt wurde sie auf die Konkurrenz um die nur begrenzt in der Zelle verfügbaren transkriptionellen Ko-Aktivatoren Protein 300 (p300) und CREB Binding Protein (CBP), die beide sowohl für die Aktivität von p53 wie auch von NF- κ B erforderlich sind (Ak und Levine 2010). Gemäß dem hier vorgestellten Modell kann p53 eine hemmende Wirkung auf NF- κ B auch über die Expression von Wip1, HTRA2 und Diablo ausüben.

Der hohe Anteil gelber Matrixelemente in der Abhängigkeitsmatrix zeigt, dass die meisten regulatorischen Komponenten sowohl über aktivierende als auch über inhibitorische Signalwege verbunden sind. Dies deutet auf einen hohen Vernetzungsgrad der Signalwege hin, was die Signalverarbeitung fördern könnte. Die überwiegende Koinzidenz aktivierender und inhibitorischer Signalwege wäre auch zu erwarten, da viele Proteine in einer frühen Phase der DNA-Schadens-Antwort aktiviert (bzw. inaktiviert) und zu einem späteren

Zeitpunkt inaktiviert (bzw. aktiviert) werden (Clémenson und Marsolier-Kergoat 2009). Solch eine Inaktivierung von Signaltransduktionswegen wird als Adaptation bezeichnet, wenn sie bereits vor dem Abschluss der Reparatur der DNA eintritt. Adaptation setzt also noch während der DNA-Schadens-Antwort ein und geht beispielsweise mit temporärer Inaktivierung von Proteinen im Zuge von Oszillationen von p53 einher. Setzt das Phänomen der Inaktivierung von Signalwegen hingegen erst nach erfolgter Reparatur der DNA ein, wird es als Regeneration (engl. *recovery*) bezeichnet. In vielen Fällen wird die Inaktivierung der DNA-Schadens-Antwort durch konstitutiv aktive Phosphatasen bewirkt, die Signalproteine durch Dephosphorylierung deaktivieren. Solche Phosphatasen konkurrieren mit durch DNA-Schäden aktivierten Kinasen um die Bindung gemeinsamer Substratproteine. Sobald die Aktivitäten dieser Kinasen nachlassen, überwiegt der Einfluss der Phosphatasen auf die Substratproteine. In vielen anderen Fällen werden Adaptation und Regeneration durch Phosphatasen bewirkt, die erst durch DNA-Schäden aktiviert werden (Clémenson und Marsolier-Kergoat 2009). Ein Beispiel für eine konstitutiv aktive Phosphatase im Modell ist PP1, die p53-P dephosphoryliert (z. B. Interaktion 29, Li et al 2006a), und nach Schädigung der DNA temporär durch p53 aktivierende Kinasen vom gemeinsamen Substrat p53 verdrängt wird (Interaktion 20, Li et al 2006a). Demgegenüber wird die Phosphatase Wip1 erst durch die DNA-Schadens-Antwort aktiviert (Interaktion 82, Fiscella et al 1997). Wip1 bewirkt die Inaktivierung vieler Signalwege, die u. a. wiederum zu Wip1 führen (z. B. Interaktion 21, Shreeram et al 2006). Damit schaltet Wip1 seine eigene Aktivierung ab und ist damit Bestandteil negativer FLs im Modell. Es wurden in dieser Arbeit nur FLs identifiziert, die im logischen Modell funktionell sind, die also - im Falle der gefundenen negativen FLs - Oszillationen im Modell verursachen (Abb. 4.3a-g). Funktionelle positive FLs wurden nicht gefunden. Eine Funktionalität erfordert Zustände des Modells, in denen jeweils alle Interaktionen eines gegebenen (positiven oder negativen) FLs aktiv sein können (Naldi et al 2007). Für eine Funktionalität *in vivo* ist dieses Kriterium jedoch nicht notwendig. Beispielsweise kann der aus p53-P, MDM2 und MDMX gebildete (im logischen Modell nicht funktionelle) FL (Abb. 3.3) funktionell sein, wenn die beteiligten Interaktionen (schwarze Kanten) höhere oder niedrigere Reaktionsgeschwindigkeiten als die Inhibition von p53-P durch MDM2 (graue Kante) aufweisen. Die in Abb. 4.3a-g dargestellten FLs sind *in vivo* nicht notwendigerweise, aber mit höherer Wahrscheinlichkeit als andere FLs des Modells funktionell, da der Funktionalitätskontext eines gegebenen FLs für alle konstituierenden Proteine identisch ist. Die von den FLs in Abb. 4.3a-c vermittelten Oszillationen von p53 wurden bereits in computergestützten Analysen und experimentell nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung untersucht (Batchelor et al 2009). Somit wurde eine Funktionalität dieser FLs *in vivo* nachgewiesen. Wie kürzlich vorgeschlagen, spielt die Dauer der Oszillationen von p53 eine entscheidende Rolle in der Entscheidung über das Schicksal

von Zellen mit geschädigter DNA. Diese Annahme beruht auf Analysen eines ODE-Modells aus vier Modulen: ein DNA-Reparatur-Modul, ein ATM-Modul, ein Feedback-Modul und ein Zellzyklus-Arrest/Apoptose-Modul. Wie in dieser Studie gezeigt, führt die Behandlung mit ionisierender Strahlung zu Oszillationen der Konzentration von p53. Diese gehen mit Phosphorylierungen von p53 an Serin 15 und 20 einher, die Zellzyklus-Arrest bewirken. Kann die geschädigte DNA nicht während einer kritischen Zahl an Pulsen repariert werden, so wird p53 bei erhöhter Konzentration stabilisiert und auch an Serin 46 phosphoryliert. Dadurch entfaltet p53 seine pro-apoptotische Funktion (Zhang et al 2011b). Auf der Grundlage des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Modells wurden drei weitere negative FLs entdeckt, die zumindest im logischen Modell funktionell sind (Abb. 4.3d-f), und daher ebenfalls zum oszillatorischen Verhalten von p53 *in vivo* beitragen könnten. Weiterhin wurde im Modell eine große Zahl kohärenter FFLs gefunden, die an der Übermittlung von Signalen von der geschädigten bzw. reparierten DNA zu p53 beteiligt sind und dessen Phosphorylierung regulieren (Abb. 4.3C, D, F-J, L-T und V-Y). Demgegenüber wurde nur ein inkohärenter FFL gefunden, der Signale zu p53 weiterleitet und zur Regulierung von dessen Phosphorylierung führt (Abb. 3Ö). Diese Phosphorylierungen an Serin 15 oder 20 bzw. anschließend an Serin 46 regulieren p53, was zum Zellzyklus-Arrest bzw. zur Apoptose führt (Vousden und Prives 2009, Jiang et al 2010). Potentiell können kohärente FFLs *in vivo* je nach Typ kurz andauernde „AN“- oder „AUS“-Signale ausfiltern. Alle identifizierten FFLs, die Signale zu p53 weiterleiten außer einem (Abb. 4.3Ö) könnten die Weiterleitung von „AN“- oder „AUS“-Signalen verzögern. Dabei würden kurzzeitige „AN“- oder „AUS“-Signale, die entweder durch Signalrauschen oder rasch beseitigte DNA-Schäden entstehen, nicht oder kaum weitergeleitet. Ebenso würden kurzzeitige „AUS“-Signale, die durch kurzzeitige Feedback-Inhibition von Signalwegen entstehen, ausgefiltert. Entsprechend würden vorwiegend lang anhaltende Signale die Einleitung von Zellzyklus-Arrest oder Apoptose durch p53 beeinflussen. Für die ebenfalls an der Induktion der transkriptionellen Aktivität beteiligte Acetylierung von p53 wurde eine derart verzögerte Aktivierung bereits demonstriert. Sowohl experimentell als auch durch Modellierung wurde gezeigt, dass bereits geringfügige DNA-Schäden, wie sie allein durch Stoffwechselprodukte ohne Einwirkung externer DNA-schädigender Agenzien ausgelöst werden, zu Oszillationen der Konzentration von p53 führen können. Jedoch führt nur eine lang andauernde DNA-Schadens-Antwort zur Aktivierung transkriptioneller Aktivitäten von p53 durch Acetylierung (Loewer et al 2010). Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass auch die durch DSBs ausgelöste Phosphorylierung von p53 bevorzugt durch eine lang andauernde Signaltransduktion beeinflusst wird.

Aufgrund der Schlüsselrolle von NF- κ B in der Aktivierung der Expression anti-apoptotischer Gene in der DNA-Schadens-Antwort kommt diesem Transkriptionsfaktor ebenfalls eine

wichtige Rolle in der Entscheidung über Leben und Tod geschädigter Zellen zu (McCool und Miyamoto 2012). Daher wurde hier untersucht, ob NF- κ B durch ähnliche Mechanismen wie p53 reguliert wird. Tatsächlich verursacht der NF- κ B regulierende FL in Abb. 4.3g bei Behandlung von Zellen mit verschiedenen Stimuli, wie TNF- α , Oszillationen der Konzentration von NF- κ B. Dies wurde experimentell nachgewiesen und modelliert (Cheong et al 2008). Die im logischen Modell der vorliegenden Arbeit gefundene Funktionalität des negativen FL in Abb. 4.3g deutet auf Oszillationen von NF- κ B auch in Reaktion auf SSBs (und damit einhergehende DSBs) und DSBs hin. Zudem könnte die Aktivierung von NF- κ B wie die von p53 verzögert ablaufen. Darauf deutet die Identifizierung der - potentiell die Signalweiterleitung verzögernden - kohärenten FFLs in Abb. 4.3A, Z und Ä hin, welche die Aktivität von IKK ϵ -S-P bzw. des IKK-Komplexes regulieren, und damit Signale zu NF- κ B weiterleiten. Entsprechend würden die Zielgene auch dieses Transkriptionsfaktors nur infolge lang andauernder, für die Zelle nicht tolerierbarer DSBs exprimiert. Damit würden die überwiegend durch NF- κ B vermittelten anti-apoptotischen Mechanismen nur nach lang anhaltender Signaltransduktion induziert.

Die kleinen Signifikanzwerte (p -Werte) der kohärenten FFLs im Modell indizieren, dass es sich um Netzwerk motive handelt, also um strukturelle Motive, deren Anzahl sich in der Evolution des Netzwerks durch positive Selektion erhöht hat (Alon 2007a). Dieser Befund stützt die Schlussfolgerung, dass ihre potentielle Funktion, die selektive Weiterleitung lang anhaltender Signale, eine besondere Rolle in der DNA-Schadens-Antwort spielt. Auf diese Weise könnten kurzzeitige Störsignale keine fehlerhafte Entscheidung über Zellzyklus-Arrest und Reparatur einerseits oder Apoptose andererseits bewirken.

Ausgehend vom oszillatorischen Verhalten von p53 und NF- κ B kommt diesen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Bedeutung in der Dynamik der DNA-Schadens-Antwort zu. Um die für dynamische Analysen erforderliche Rechenleistung zu senken, wurde das Netzwerk reduziert. In einer früheren Arbeit wurde eine Methode zur Reduktion Boolescher Modelle auf ihre funktionellen Interaktionen beschrieben (Tournier und Chaves 2009). Da diese Methode allerdings nur auf Modelle mit maximal 20 Variablen anwendbar ist, wurde stattdessen eine in *GINSim* implementierte Methode verwendet, die sich auch zur Reduktion größerer Netzwerke eignet (siehe Material und Methoden). Das reduzierte Netzwerk trat bei Anwendung eines asynchronen Aktualisierungsschemas mit den definierten Prioritätsklassen nach einer Reihe von Zustandsübergängen in einen komplexen zyklischen Attraktor ein (Abb. 4.4a). Die identifizierten Attraktoren der Modellvarianten in Abb. 4.4 entsprechen dem Verhalten der DNA-Schadens-Antwort vor Vollendung der Reparatur bzw. dem Eintritt des Zelltods. Der Grund ist die Tatsache, dass CELL CYCLE ARREST und ONSET OF APOPOSIS die Komponenten der Ausgangsebene darstellen, und nachfolgende Zustände der DNA-Schadens-Antwort somit nicht vom Modell wiedergegeben werden. Die

Identifizierung des komplexen zyklischen Attraktors in Abb. 4.4a bedeutet daher, das Signaltransduktionsnetzwerk im Wildtyp-Zustand (4.4A) könnte vor Vollendung von DNA-Reparatur respektive Apoptose in einen Zyklus aus verflochtenen Trajektorien eintreten. Ausgehend vom oben erwähnten Modell in Zhang et al (2011b) entsprechen die Zustände des zyklischen Attraktors der Phase, in welcher in der Zelle die Entscheidung über DNA-Reparatur oder Apoptose getroffen wird. Mutationen, die zur Unterbrechung aller funktionellen FLs führen oder sie infunktionell werden lässt, haben zur Folge, dass das Netzwerk nach einer Reihe von Zustandsübergängen anstelle eines zyklischen Attraktors einen logischen stationären Zustand einnimmt. Dies könnte etwa durch eine konstitutive Phosphorylierung von p53 an den Serinresten 15 und 20 bewirkt werden, wie Abb. 4.4e zeigt. Wie aus Abb. 4.4E ersichtlich ist und oben diskutiert wurde, hat p53 inhibitorischen Einfluss auf NF- κ B. Daher gehen die konstitutiven Phosphorylierungen von p53 an Serin 15 und 20 mit konstitutiver Inaktivität von NF- κ B einher. Somit oszillieren p53 und NF- κ B nicht mehr, das Netzwerk nimmt daher einen logischen stationären Zustand ein (Abb. 4.4e). In diesem Zusammenhang ist zu betonen, dass das Netzwerk *in vivo* einigen der identifizierten Trajektorien mit höherer Wahrscheinlichkeit folgt, als anderen. Auch ist es möglich, dass Zellen einige Zustände des logischen Modells überhaupt nicht einnehmen. Nähere Informationen darüber könnten mit kinetischen Modellen gewonnen werden.

Zusammengefasst deuten die identifizierten funktionellen FLs und die Ergebnisse der Analyse der Attraktoren unabhängig voneinander auf essentielle Rollen von p53 und NF- κ B in der Generierung zyklischer Attraktoren der DNA-Schadens-Antwort hin. Dies unterstreicht zusammen mit dem Befund, dass die meisten identifizierten FFLs entweder p53 und NF- κ B regulieren, die entscheidende Bedeutung dieser Proteine für die Dynamik der DNA-Schadens-Antwort und für die Entscheidung der Zelle zwischen DNA-Reparatur oder Zelltod.

5.2 Identifizierung potentieller therapeutischer Zielproteine und die Rolle von Biomarkern

Trotz der Erfolge in der Bekämpfung von Tumoren mit DNA-schädigenden Radio- und Chemotherapien haben diese Heilverfahren Limitierungen. So werden neben Tumorzellen auch normale Zellen geschädigt; das gilt insbesondere für Zellen mit hohen Proliferationsraten, wie in Haarfollikeln, im Verdauungstrakt und im Knochenmark. Daraus ergeben sich Nebenwirkungen, wie Haarausfall, Übelkeit und die Hemmung der Blutbildung (Myelosuppression). Zusätzlich kann die Wirksamkeit DNA-schädigender Agenzien auf Tumoren beispielsweise durch molekulare Defekte pro-apoptotischer Proteine wie p53 herabgesetzt sein. Diese Limitationen senken den therapeutischen Index DNA-schädigender Agenzien, also das Verhältnis der therapeutischen zur toxischen Dosis eines Medikaments (Zhou und Bartek 2004). Allerdings kann der therapeutische Index DNA-schädigender

Agenzien durch Hemmung von Signaltransduktionswegen, die in Tumorzellen zum temporären Zellzyklus-Arrest, zur Seneszenz oder zur Aktivierung von NF- κ B führen, erhöht werden (Al-Ejeh et al 2010, Deorukhar und Krishnan 2010). Nach dem Eintreten von reparablen DNA-Schäden ist das Überleben normaler Zellen oftmals durch mehrere redundante Signalwege gewährleistet, während das Überleben von Tumorzellen oftmals von vergleichsweise wenigen intakten Signalwegen abhängt. Kenntnisse über die genetische Konstitution eines zu bekämpfenden Tumors ermöglichen die Identifizierung dieser für das Überleben dieses Tumors essentiellen Signalwege (Al-Ejeh et al 2010). Einige mutierte Gene beeinflussen sogar maßgeblich die Sensibilität der entsprechenden Tumorzellen für Therapeutika und stellen daher geeignete Biomarker für die Wahl geeigneter therapeutischer Interventionen dar (McDermott und Settleman 2009). Die Bedeutung solcher Biomarker für die Identifizierung einer geeigneten Therapie wurde in zwei kürzlich publizierten Arbeiten hervorgehoben. In einer dieser Publikationen wird die *Cancer Cell Line Encyclopedia* vorgestellt, eine Zusammenstellung genetischer Daten (inklusive Genexpressionsdaten) von 947 Krebszelllinien. Die Kopplung dieser Daten mit pharmakologischen Profilen von 24 Chemotherapeutika ermöglichte die Identifizierung potentieller Biomarker zur Abschätzung der Wirksamkeit dieser Therapeutika (Barretina et al 2012). In einer anderen Studie wurden mehrere hundert Tumorzelllinien mit 130 potentiellen Chemotherapeutika behandelt. In einem Screening wurden Korrelationen zwischen häufigen Mutationen und der Sensibilität für die potentiellen pharmazeutischen Wirkstoffe gefunden. Daher könnten diese Mutationen künftig bei der Planung geeigneter Therapien als Biomarker dienen (Garnett et al 2012). Auch die Eignung der in der vorliegenden Arbeit identifizierten potentiellen Zielproteine zur Sensibilisierung von Karzinomen zeigt eine ausgeprägte Abhängigkeit von der genetischen Konstitution des zu bekämpfenden epithelialen Tumors. Für die häufigen Karzinome mit dysfunktionalem p53, HIPK2, ATM oder Chk2 wurden jeweils Gruppen von Zielproteinen zur Potenzierung des Zelltodes infolge DNA-schädigender Therapien identifiziert (Tab. 4.2). Allerdings bestehen nicht nur zwischen Tumoren desselben Typs in verschiedenen Patienten genetische und molekulare Unterschiede in der DNA-Schadens-Antwort, sondern auch zwischen primären Tumoren (Ursprungstumoren) einerseits und Metastasen im selben Patienten andererseits können solche Unterschiede bestehen. Selbst in verschiedenen Teilen (lokalen Klonen) eines einzelnen Tumors können unterschiedliche Mutationen und Proteinfunktionen vorherrschen. So wurde auch in Bezug auf den in dieser Arbeit ausgewählten Biomarker p53 eine klonale Heterogenität von Tumoren beschrieben. Je heterogener ein Tumor in Bezug auf diesen oder andere Biomarker ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Subklon seiner Zellen gegen eine gegebene Therapie resistent ist (Marusyk und Polyak 2010, Gerlinger et al 2012). Aus diesen Gründen könnte eine Sensibilisierung heterogener Karzinome für genotoxische Therapien eine Kombination

mehrerer Sensibilisierungsstrategien erfordern. Jede Gruppe von Zielproteinen, die in dieser Arbeit identifiziert wurde, kann dabei zur Sensibilisierung der Teile eines Karzinoms eingesetzt werden, in denen der betreffende Biomarker (p53, HIPK2, ATM oder Chk2) dysfunktional ist. Wie oben erwähnt, ist in den meisten Karzinomzellen zumindest eines dieser Proteine dysfunktional, wobei schon allein 50–70% der Karzinomzellen p53-defizient sind (Schuijjer et al 2003, Iacopetta et al 2003). Daher könnte der Einbezug jeweils mehrerer vorgeschlagener Gruppen von Zielproteinen in die Therapie eine Sensibilisierung vieler heterogener Karzinome ermöglichen. Alternativ zu den Zielmolekülen der DNA-Schadens-Antwort können zur Sensibilisierung von Tumorzellen für genotoxische Therapien auch Moleküle anderer Signalwege inhibiert werden. So werden etwa Inhibitoren gegen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Proteine, die in die Angiogenese (das Blutgefäßwachstum) involviert sind, erfolgreich zur Radio- und Chemosensibilisierung von Tumoren eingesetzt, bzw. sind in der klinischen Erprobung (Tofilon und Camphausen 2009). Einige der im vorliegenden Modell gefundenen Gruppen potentieller Zielproteine enthalten ATR oder Chk1, die neben ihren Funktionen, die sie in der DNA-Schadens-Antwort haben, essentielle Rollen in der Replikation der DNA und damit in der Proliferation von Zellen spielen (Nam und Cortez 2011, Petermann et al 2010). Dennoch hemmt eine temporäre partielle Inhibition von ATR oder Chk1 während der DNA-Schadens-Antwort eher die Induktion von Zellzyklus-Arrest als die Proliferation (Wagner und Kaufman 2010, Ma et al 2011). Zudem enthalten einige Gruppen potentieller Zielproteine zur Sensibilisierung Chk2-defizienter Karzinome p53. Obgleich dieses Protein Apoptose induzieren kann, vermittelt es in Chk2-defizienten Zellen vorrangig Zellzyklus-Arrest und trägt damit zum Überleben der Tumorzelle in der DNA-Schadens-Antwort bei (Reinhardt et al 2009). Entsprechend könnte die Inhibition von p53 einige Tumore für DNA-schädigende Therapien sensibilisieren (Gudkov und Komarova 2005). Daher könnte die hier für einige Karzinome vorgeschlagene Inhibition von p53 zur Unterstützung DNA-schädigender Therapien sinnvoll sein.

Einige der vorgeschlagenen Gruppen von Zielproteinen zur Chemo- und Radiosensibilisierung enthalten bereits früher vorgeschlagene Zielproteine für effizientere Behandlungen von Karzinomen. Dazu gehören ATM, ATR, Chk1 und TAK1 (Tab. 4.1). Gegenwärtig befinden sich pharmakologische Inhibitoren von Chk1 in der klinischen Erprobung. Dazu gehört 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01) (Ma et al 2011, <http://www.keryx.com>). Dieser Inhibitor hemmt den Zellzyklus-Arrest in der S- und der G2-Phase des Zellzyklus. Dadurch fördert UCN-01 den Zelltod in Tumoren in synergistischer Weise zusammen mit DNA-schädigenden Therapeutika wie dem Camptothecin-Derivat Irinotecan. Besonders ausgeprägt ist dieser sensibilisierende Effekt in p53-defizienten Tumoren (Ma et al 2011). Jedoch führen Inhibitionen dieser früher vorgeschlagenen Zielproteine mit Ausnahme von ATM nur zur Hemmung eines Teils der

Überlebensmechanismen im Modell. Daher bleiben einige der zum Überleben von Karzinomen führenden Signalwege intakt. Darüber hinaus ist oftmals selbst in klinischen Studien noch unklar, inwieweit das Wirkprofil eines Arzneistoffs zur Chemo- oder Radiosensibilisierung von der genetischen Konstitution des Tumors abhängt (Lord und Ashworth 2012). Dahingegen eignen sich die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Gruppen von Zielproteinen potentiell zur Hemmung aller noch intakten im Modell enthaltenen Überlebensmechanismen in den jeweiligen Karzinomzellen. Folglich könnte die Hemmung dieser Zielproteine die betreffenden Karzinomzellen mit höherer Effizienz für DNA-schädigende Agenzien sensibilisieren. Darüber hinaus ist mit dem Modell für alle Gruppen potenzieller Zielproteine die Abhängigkeit der Wirkung ihrer Inhibition von den Funktionszuständen bestimmter in Karzinomen häufiger defekter Proteine definiert. Nach experimenteller Überprüfung könnten die vorgeschlagenen Zielstrukturen im Sinne einer personalisierten Medizin zur selektiven Chemo- und Radiosensibilisierung von Karzinomen in Abhängigkeit von ihrer genetischen Konstitution eingesetzt werden.

5.3 Erkrankungen, die mit Defekten in der DNA-Schadens-Antwort einhergehen

Die meisten bisherigen Studien über die Bedeutung molekularer Defekte in der Tumorgenese oder in Erbkrankheiten fokussierten auf die Funktionen einzelner Gene oder Genprodukte. Für ein Verständnis der veränderten Signaltransduktion, über die sich molekulare Defekte auf den Phänotyp einer Zelle auswirken, sind Netzwerkanalysen jedoch essentiell (Kreeger und Lauffenburger 2010). So wurde gezeigt, dass mithilfe einer stochastischen Netzwerkanalyse molekulare Interaktionen (zwischen Proteinen bzw. Proteinen und DNA sowie posttranslationale Modifikationen) identifiziert werden können, die in B-Zell-Lymphomen, einer Form von Lymphdrüsentumoren, dereguliert sind (Mani et al 2008). Bisher beinhalteten jedoch nur wenige Arbeiten zur Untersuchung genetischer Erkrankungen Netzwerkanalysen.

In dieser Arbeit wurde die defekte DNA-Schadens-Antwort in fünf Erbkrankheiten, die durch Mutationen der für ATM, Mre11, Nbs1 bzw. Rad50 kodierenden Gene bzw. auf die verminderte Expression von ATR zurückzuführen sind, simuliert. Dabei konnten zahlreiche in der Literatur beschriebene molekulare und zelluläre Defekte reproduziert und Prädiktionen über Netzwerk-weite Auswirkungen erzielt werden (Tab. 4.3). Nicht vom Modell erklärt werden konnte die Tatsache, dass die erhöhte Inzidenz von Krebserkrankungen beim Louis-Bar-Syndrom und beim Nijmegen-Breakage-Syndrom speziell das Lymphsystem betreffen. Zumindest im Louis-Bar-Syndrom (dysfunktionales ATM) ist dies zumindest teilweise auf die Rolle von ATM in der Rekombination von Immunglobulinen zurückzuführen (Lavin 2008). Diese auf Zellen des Immunsystems beschränkten Funktionen von ATM sind aber nicht im Modell vertreten. Obgleich Zellen von Patienten mit ATR-Seckel-Syndrom keine ausgeprägte

Diskussion

Radiosensibilität oder Prädisposition für Krebserkrankungen zeigen (O'Driscoll et al 2004), ist die Aktivierung eines Teils der Signalwege zum Zellzyklus-Arrest in der Simulation gehemmt. Möglicherweise führt die Reduktion der Konzentration von ATR *in vivo* nicht zum Ausfall dieser Signalwege, wie das im Modell nach (vollständiger) Inaktivierung von ATR der Fall ist. Eine andere Erklärung wäre, dass die anderen noch aktiven Signalwege zum Zellzyklus-Arrest diesen Ausfall *in vivo* kompensieren. Da die vollständige Inaktivierung von ATR im qualitativen Modell eine Vereinfachung darstellt, sind quantitative Modellierungen dieser Signalwege zur weiteren Klärung dieser Frage geeigneter.

Wie oben erläutert, tragen molekulare Defekte in der DNA-Schadens-Antwort, die den Ausfall von apoptotischen oder zum Zellzyklus-Arrest führenden Signalwegen bewirken, zur Tumorgenese bei. Daher wurde im logischen Modell nach solchen molekularen Defekten gesucht. Es ist wichtig zu beachten, dass diese molekularen Defekte hingegen zum Zelltod führen könnten, wenn die DNA der Zelle massiv geschädigt wird, wie dies etwa in Krebstherapien erfolgt, aber nicht dem Regelfall in ungestörten Zellen entspricht. Demgegenüber werden geringfügige DNA-Schäden permanent erzeugt, etwa durch Reaktive Sauerstoffspezies aus dem Metabolismus. Derartige begrenzte DNA-Schäden entsprechen daher dem Regelfall in der Zelle (de Bont et al 2004). Die gesuchten Defekte fördern potentiell die Karzinogenese in Zellen mit geringfügigen DNA-Schäden, indem potentiell die unkontrollierte Proliferation ermöglicht wird. Die Defekte (konstitutive Aktivierungen oder Inaktivierungen) von Proteinen können durch Mutationen der sie kodierenden Gene verursacht werden (Driver-Mutationen).

Es wurden im logischen Modell 117 Kombinationen von Defekten gefunden, die potentiell zur Karzinogenese beitragen (Tab. 4.4). Unter den Resultaten sind konstitutiv inaktive Formen der bekannten bzw. vermuteten Tumor-Suppressoren ATM, Nbs1 (im Modell als Untereinheit des MRN-Komplexes), Fragile histidin triad gene (FHIT), p53, BRCA1 (*The Tumor Gene Family of Databases*) und Chk2 (Sherr 2004) sowie konstitutiv aktive Formen des bekannten Onkogens MDM2 (*The Tumor Gene Family of Databases*). In 21 Kombinationen ist NF- κ B (p50-p65-P) konstitutiv aktiv, was tatsächlich in vielen Tumoren beobachtet wurde (Karin 2006). Bemerkenswert ist, dass gemäß den Ergebnissen sowohl die konstitutiv hohe Aktivität als auch die konstitutive Inaktivität von I κ B α oder des IKK-Komplexes zur Karzinogenese beitragen könnte. Die meisten identifizierten Defekte wurden bisher nicht mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Die betreffenden Proteine könnten von „*low penetrance*“ Genen kodiert werden, die Anfälligkeit bzw. Resistenz gegen die Tumorgenese vermitteln könnten (Loeb et al 2003, Balmain et al 2003, Sherr 2004). Es wurde vorgeschlagen, dass Kombinationen solcher Tumor-Resistenz-Gene (engl. *tumour resistance genes*) und Tumor-Anfälligkeits-Gene (engl. *tumour susceptibility genes*) eine Dosis-abhängige Wirkung auf relevante Prozesse der Tumorgenese haben. Ein wesentliches

Hindernis für die experimentelle Identifizierung dieser molekularen Defekte ist die enorm hohe Zahl möglicher zu untersuchender Kombinationen (Balmain und Nagase 1998, Sherr 2004). Die Resultate der logischen Analysen stellen Kandidaten für potentiell zur Karzinogenese beitragende Ereignisse dar und grenzen die Zahl der relevanten Kombinationen ein. Sie bilden daher eine wertvolle Vorauswahl für nachfolgende Experimente.

5.4 Schlussfolgerungen

Das in dieser Arbeit auf der Grundlage von Literaturdaten über menschliche Epithelzellen erstellte logische Modell ist das bislang umfangreichste Modell der DNA-Schadens-Antwort menschlicher Zellen. Der Umfang des Modells und der Einbezug einer Vielzahl posttranslationaler Modifikationen ermöglichte in den Simulationen die Berücksichtigung zahlreicher komplexer Wechselwirkungen zwischen Signalwegen. Mithilfe des Modells wurden neue Erkenntnisse über die Dynamik der DNA-Schadens-Antwort, insbesondere über den Verlauf der Aktivierung von p53 und NF- κ B, gewonnen. Die Tatsache, dass die Karzinogenese gewöhnlich mit molekularen Defekten der DNA-Schadens-Antwort einhergeht, ermöglichte einerseits die Identifizierung potentieller Zielproteine zur maßgeschneiderten Radio- und Chemosensibilisierung von Karzinomen mit bestimmten Mutationen und andererseits die Identifizierung molekularer Defekte, welche die Karzinogenese fördern könnten. Darüber hinaus wurde die mit einigen Erbkrankheiten einhergehende veränderte DNA-Schadens-Antwort analysiert. Zusammenfassend geben die Ergebnisse einen Überblick über die DNA-Schadens-Antwort sowohl in gesunden Zellen wie auch in pathophysiologischen Zuständen. Die *In-silico*-Ergebnisse stellen eine Vorauswahl für gezielte Experimente in Zellkulturstudien dar. Da zudem das vorliegende Modell wie jedes logische Modell ein widerspruchsfreies Grundgerüst des untersuchten Netzwerks darstellt, bildet es eine Grundlage für quantitative Modelle (Wittmann et al 2009). Der Einbezug weiterer quantitativer Daten in das vorliegende Modell im Rahmen von nachfolgenden Arbeiten könnte die Rekapitulation der Beobachtungen ermöglichen, dass geringfügige DNA-Schäden vorrangig temporären Zellzyklus-Arrest und DNA-Reparatur induzieren, während schwerwiegendere Schäden der DNA in der Regel zur Apoptose führen.

6.A Zusammenfassung

Zellen sind permanent chemischen und physikalischen Agenzien ausgesetzt, die Schäden der DNA verursachen. Diese können lebenswichtige Funktionen der Zellen, wie die Replikation der DNA und die Transkription blockieren. Zellen reagieren auf diese Schäden mit der Aktivierung eines Netzwerks aus Signaltransduktionswegen, das als DNA-Schadens-Antwort bezeichnet wird. Diese kann zum temporären Zellzyklus-Arrest führen, wodurch die Teilung von Zellen mit geschädigter DNA vermieden wird und Zeit zur Reparatur der DNA gewonnen wird. Größere DNA-Schäden führen zum Zelltod durch Apoptose, womit die Transformation in Tumorzellen verhindert wird. Der wichtigste pro-apoptotische Transkriptionsfaktor ist p53. Der Apoptose wirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B entgegen. Damit kommen p53 und NF- κ B Schlüsselfunktionen in der DNA-Schadens-Antwort zu. Alternativ können Zellen in einen Zustand permanenten Zellzyklus-Arrests, die Seneszenz, eintreten. Tumorzellen weisen meist Defekte in der DNA-Schadens-Antwort auf, die zur Beeinträchtigung von DNA-Reparatur und Apoptose führen. In vielen Krebstherapien wird eine DNA-Schadens-Antwort induziert, um Tumorzellen durch Apoptose zu eliminieren. Jedoch wird die Effizienz solcher Radio- und Chemotherapien oftmals durch den Zellzyklus-Arrest und die Aktivierung von NF- κ B gemindert. Trotz der hohen medizinischen Relevanz der DNA-Schadens-Antwort sind das Zusammenspiel der Signaltransduktionswege und seine Auswirkungen auf die Zelle bislang wenig verstanden.

In dieser Arbeit wurde ein diskretes logisches Modell der DNA-Schadens-Antwort menschlicher Epithelzellen erstellt. Es stellt das umfangreichste publizierte Modell der DNA-Schadens-Antwort in menschlichen Zellen dar. Mithilfe des Modells wurden neue Einsichten in die Dynamik der DNA-Schadensantwort erlangt. Insbesondere wurden anhand struktureller und dynamischer Analysen potentielle Mechanismen identifiziert, mit denen Zellen die Aktivitäten von p53 und NF- κ B steuern. In Simulationen therapeutischer Interventionen mit DNA-schädigenden Agenzien wurden potentielle Zielproteine zur Sensibilisierung von epithelialen Tumorzellen für diese Therapien identifiziert. Dazu wurden molekulare Defekte der DNA-Schadens-Antwort simuliert, die in Karzinomzellen verbreitet auftreten. Auf diese Weise gelang es, Zielproteine zu definieren, deren Inhibition gezielt Karzinomzellen mit bestimmten Defekten der DNA-Schadens-Antwort sensibilisieren könnte. Die Ergebnisse könnten daher für die Entwicklung von personalisierten Therapien wertvoll sein. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen bestimmter Erbkrankheiten auf die DNA-Schadensantwort im Modell untersucht. In Auswirkungsanalysen wurden molekulare Defekte gefunden, die möglicherweise zur Karzinogenese beitragen. Die Validierung des Modells erfolgte durch einen Vergleich von Prädiktionen mit Literaturdaten.

6.B Summary

Cells are permanently attacked by a variety of chemical and physical agents damaging the DNA. These lesions can block DNA replication, transcription, as well as other vital cellular functions. Cells respond to DNA damage by triggering a network of signal transduction pathways, collectively referred to as the DNA Damage Response (DDR). By entering a temporary cell cycle arrest, cells on the one hand avoid to proliferate in presence of DNA damage. On the other hand, cells gain time to fix the damage. More severe DNA damage causes cells to die by committing apoptosis, thereby preventing their transformation into tumour cells. The most important proapoptotic transcription factor is p53. However, apoptosis can be counteracted by activation of the transcription factor NF- κ B. Therefore, p53 and NF- κ B play key roles in the DDR. Alternatively, cells may enter a state of permanent cell cycle arrest, termed senescence. Most tumour cells have a defective DDR, resulting in diminished capacities to repair their DNA or enter apoptosis. DNA damage is also induced for therapeutic purposes, with the aim to eliminate tumour cells by inducing apoptosis. However, the efficiencies of such radio- and chemotherapies are strongly hampered by cell cycle arrest and activation of NF- κ B. Despite the high clinical relevance of the DDR, the crosstalk of the underlying signal transduction pathways and the implications for a damaged cell's final fate are scarcely understood.

The study presented included the construction of a discrete logical model of the DDR in human epithelial cells. It is the largest model of the DDR in human published so far. Analyses yielded new insights into the dynamics of the DDR. In particular, by combining structural and dynamical analyses, new mechanisms governing the activities of p53 and NF- κ B were found. In simulations of treatments with DNA damaging therapeutics, candidate target proteins for the sensitization of carcinoma cells to these agents were identified. By taking account for common molecular defects in carcinomas, targets were defined that might be suitable to specifically sensitize tumors carrying a certain mutation. These results might serve future developments of personalized therapies. Moreover, simulations enlightened some consequences of DDR defects being associated with some hereditary diseases. Molecular defects of DDR proteins putatively contributing to carcinogenesis were identified by means of failure mode analysis. The predictive quality of the logical model was validated on the basis of published experimental studies.

7. Abkürzungen und Symbole

A1	Bcl-2-related protein A1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and rad3-related protein
ATRIP	ATR interacting protein
Bak1	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BARB1	BRCA1 associated RING domain 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2/3/ _{XL}	B-cell lymphoma 2/3/extra large
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
Ca ²⁺	Kalziumion
c-Abl	Cellular Abelson tyrosine kinase
Cdc25A/C	Cell division cycle 25 homolog 25A/C
Cdc7	Cell division cycle 7 homolog
Cdct2	Cdc10-dependent transcript 2
Cdk/Cdk2	Cyclin-dependent kinase/2
Chk1/2	Checkpoint kinase 1/2
cIAP1	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1
c-Met	Cellular mesenchymal-epithelial transition factor
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene
CBP	CREB Binding Protein
c-Rel	C-reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
CUEDC2	CUE domain containing 2
DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Diablo	Direct IAP binding protein with low pI
DSBs	DNA double-strand breaks (DNA-Doppelstrangbrüche)
E2F-1	Adenovirus E2 gene promoter region binding factor 1
ELKS	Abkürzung aus den Einbuchstabencodes der häufigsten Aminosäuren in diesem Protein, Glutamat (E), Leucin (L), Lysin (K) und Serin (S)
engl.	englisch
ERK	Extracellular regulated kinase 1/2
FFL	Feed-Forward-Loop

Abkürzungen und Symbole

FHIT	Fragile histidin triad gene
FKBP51	FK506 binding protein 51
FL	Feedback-Loop
G1/2-Phase	Gap1/2-Phase des Zellzyklus
HDAC1	Histone deacetylase 1
HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase 2
Hsp90	Heat shock protein 90
HTRA2	High temperature requirement protein A2
HU	Hydroxyurea
HuR	Human antigen R
IKK $\alpha/\beta/\epsilon$	Inhibitor of kappa B kinase subunit $\alpha/\beta/\epsilon$
IKK-Komplex	Komplex aus IKK α , IKK β und NEMO
IL-1/6	Interleukin-1/6
I κ B α	Inhibitor of kappa B α
IR	Ionizing Radiation (hier: Röntgen- und Gammastrahlung)
Ku	Dimer aus Ku70 und Ku80 (benannt nach den molekularen Massen von ca. 70 bzw. 80 Kilodalton)
L-Segment	Lücken-DNA-Segment
LUBAC	Komplex aus Haem-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1 (HOIL-1), HOIL-1-interacting protein (HOIP) und Shank-associated RH domain-interacting protein (SHARPIN)
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
MDM2	Murine double minute 2
MDMX	Murine double minute X
MEK	MAPK/ERK kinase 1/2 (MEK1/2)
miR-34c	microRNA 34c
MK2	MAPK-activated protein kinase-2
MRN	Komplex aus Meiotic recombination 11 (Mre11), Radiation 50 (Rad50) und Nijmegen breakage syndrome 1 (Nbs1)
mRNA	Messenger-RNA
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
ODEs	Ordinary Differential Equations (Gewöhnliche Differentialgleichungen)
p21	Protein 21
p300	Protein 300
p38	Protein 38 (p38 α)
p50	Protein 50

Abkürzungen und Symbole

p52	Protein 52
p53	Protein 53
p65	Protein 65
p90	Protein 90 ribosomal protein S6 kinase
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PLC γ 1	Phospholipase C γ 1
PIASy	Protein inhibitor of activated STATy
PIDD	Protein 53-induced death domain protein
PML	Promyelocytic leukemia
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A-B55	Protein phosphatase 2A mit der Untereinheit B55
PP2A-Bx	Protein phosphatase 2A mit unbekannter B-Untereinheit
PP5	Protein phosphatase 5
Puma	Protein 53-upregulated modulator of apoptosis
RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RPA	Replication protein A
SEN2	Sentrin-specific protease 2
SN38	7-Ethyl 10-hydroxy-camptothecin
SSBs	DNA single-strand breaks (DNA-Einzelstrangbrüche)
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
T-Segment	Transfer-DNA-Segment
TAB	TGF- β activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2/3 (TAB2 oder TAB3)
TAK1	TGF- β activated kinase 1
TNF- α	Tumour necrosis factor α
TOP1/2	Topoisomerasen vom Typ I/II
TopBP1	Topoisomerase binding protein 1
TOPORS	Topoisomerase I-binding protein
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
Ubc13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UCN-01	7-Hydroxystaurosporin
UV/UVC	Ultraviolette/Ultraviolette C-Strahlung
VP16	VePesid [®] (Etoposid)
Wip1	Wild-type p53-induced phosphatase
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

,!' logisches NICHT, ,.' logisches UND

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1 Schema der DNA-Schadens-Antwort	5
Abb. 1.2 Signaltransduktion zur Aktivierung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Einwirkung DSBs-induzierender Agentien	8
Abb. 1.3 Katalyse durch Topoisomerasen	10
Abb. 1.4 Umwandlung von SSBs in DSBs	12
Abb. 1.5 Netzwerk motive	14
Tab. 3.1 Qualitätskriterien zur Aufnahme von Daten in das Modell	24
Abb. 3.1 Binäre Stufenfunktion als Näherung der Hill-Funktion	26
Abb. 3.2 Interaktionsgraph und logischer Interaktionshypergraph	29
Abb. 3.3 Funktionalitätskontext von Feedback-Loops im logischen Modell	32
Abb. 3.4 Zustandsübergangsgraphen eines Netzwerks	35
Abb. 4.1 Logischer Interaktionshypergraph der DNA-Schadens-Antwort	40
Tab. 4.1A Validierung des Modells mit Literaturdaten: Wirkungen von Inhibitionen auf Zellen mit funktionellem p53	42
Tab. 4.1B Validierung des Modells mit Literaturdaten: Wirkungen von Inhibitionen auf Zellen ohne funktionelles p53	42
Abb. 4.2 Abhängigkeitsmatrix	45
Abb. 4.3 Feed-Forward-Loops (FFLs) und Feedback-Loops (FLs)	48
Abb. 4.4 Abhängigkeit der Dynamik der DNA-Schadens-Antwort von p53 und NF- κ B	50
Tab. 4.2 Potentielle Zielproteine zur Sensibilisierung von Karzinomen	52
Tab. 4.3 Simulationen der DNA-Schadens-Antwort bei Erbkrankheiten	54
Tab. 4.4 Kombinationen konstitutiver Aktivitäten und Inaktivitäten, die potentiell die Karzinogenese fördern	57
Anhang 1: Logische Funktionen des Modells	95
Anhang 2: Vorarbeiten von Dr. Raimo Franke für diese Arbeit	101
Anhang 3: Logische stationäre Zustände der detaillierten Modellvarianten	102
Anhang 4: Von der Suche nach potentiellen therapeutischen Zielstrukturen ausge- schlossene Spezies	103
Anhang 5: Aktivitäten und Inaktivitäten, die von der Suche nach molekularen Defekten, die potentiell zur Karzinogenese beitragen, ausgeschlossen wurden	103

9. Literaturverzeichnis

Abou-Jaoudé W, Ouattara DA, Kaufman M. From structure to dynamics: Frequency tuning in the p53–Mdm2 network I. Logical approach. *J Theor Biol.* 2009;258(4):561-77.

Adams KE, Medhurst AL, Dart DA, Lakin ND. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene.* 2006;25(28):3894-3904. Epub 2006 Feb 13.

Ahmed KM, Nantajit D, Fan M, Murley JS, Grdina DJ, Li JJ. Coactivation of ATM/ERK/NF-kappaB in the low-dose radiation-induced radioadaptive response in human skin keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(11):1543-50. Epub 2009 Mar 24.

Ak P, Levine AJ. p53 and NF-κB: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J.* 2010 Oct;24(10):3643-52. Epub 2010 Jun 8. Review.

Albert R, Wang RS. Discrete dynamic modeling of cellular signaling networks. *Methods Enzymol.* 2009;467:281-306.

Aldridge BB, Burke JM, Lauffenburger DA, Sorger PK. Physicochemical modelling of cell signalling pathways. *Nat Cell Biol.* 2006 Nov;8(11):1195-203. Review.

Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegman A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK. Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene.* 2010 Nov 18;29(46):6085-98. Epub 2010 Sep 6. Review.

Ali A, Zhang J, Bao S, Liu I, Otterness D, Dean NM, Abraham RT, Wang XF. Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev.* 2004;18(3):249-54.

Allen, Linda J. S., *An Introduction to Stochastic Processes with Applications to Biology*, 2th Edition, Chapman and Hall, 2010.

Alon U. *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. Chapman and Hall/CRC, 2007a.

Alon U. Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet.* 2007b Jun;8(6):450-61. Review.

Anderson VE, Walton MI, Eve PD, Boxall KJ, Antoni L, Caldwell JJ, Aherne W, Pearl LH, Oliver AW, Collins I, Garrett MD. CCT241533 is a potent and selective inhibitor of CHK2 that potentiates the cytotoxicity of PARP inhibitors. *Cancer Res.* 2011 Jan 15;71(2):463-72.

Andoh T, Ishida R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1400(1-3):155-71.

Andrec M, Khodolenko BN, Levy RM, Sontag E. Inference of signaling and gene regulatory networks by steady-state perturbation experiments: structure and accuracy. *J Theor Biol.* 2005 Feb 7;232(3):427-41.

Antocchia A, Kobayashi J, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K. Volff JN (ed): *Genome and Disease*. *Genome Dyn.* Basel, Karger, 2006; vol 1. 191–205.

Literaturverzeichnis

- Ard PG, Chatterjee C, Kunjibettu S, Adside LR, Gralinski LE, McMahon SB. Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug;22(16):5650-61.
- Arlander SJ, Eapen AK, Vroman BT, McDonald RJ, Toft DO, Karnitz LM. Hsp90 inhibition depletes Chk1 and sensitizes tumor cells to replication stress. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):52572-77. Epub 2003 Oct 21.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003;421(6922):499-506.
- Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(3):241-46. Review.
- Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005;5(4):363-72.
- Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:238-44. Review.
- Balmain A, Nagase H. Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers. *Trends Genet.* 1998 Apr;14(4):139-44. Review.
- Bao-Lei T, Zhu-Zhong M, Yi S, Jun-Jie Q, Yan D, Hua L, Bin L, Guo-Wei Z, Zhi-Xian S. Knocking down PML impairs p53 signaling transduction pathway and suppresses irradiation induced apoptosis in breast carcinoma cell MCF-7. *J Cell Biochem.* 2006 Feb 15;97(3):561-71.
- Barbi G, Scheres JM, Schindler D, Taalman RD, Rodens K, Mehnert K, Müller M, Seyschab H. Chromosome instability and X-ray hypersensitivity in a microcephalic and growth-retarded child. *Am J Med Genet.* 1991 Jul 1;40(1):44-50.
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jané-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P Jr, de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* 2012 Mar 28;483(7391):603-07.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene.* 2007 Dec 10;26(56):7773-79. Review.
- Bartling B, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Endogenously released Smac is insufficient to mediate cell death of human lung carcinoma in response to etoposide. *Exp Cell Res.* 2004 Aug 1;298(1):83-95.
- Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature.* 1997 May 29;387(6632):516-19.

Literaturverzeichnis

Batchelor E, Loewer A, Lahav G. The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells. *Nat Rev Cancer*. 2009 May;9(5):371-77. Epub 2009 Apr 9.

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*. 1998 Sep 24;8(19):1049-57.

Berchtold CM, Wu ZH, Huang TT, Miyamoto S. Calcium-dependent regulation of NEMO nuclear export in response to genotoxic stimuli. *Mol Cell Biol*. 2007;27(2):497-509. Epub 2006 Oct 30.

Bitomsky N, Hofmann TG. Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J*. 2009 Nov;276(21):6074-83. Epub 2009 Sep 29. Review.

Biton S, Ashkenazi A. NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF- α feedforward signaling. *Cell*. 2011 Apr 1;145(1):92-103.

Blackford AN, Patel RN, Forrester NA, Theil K, Groitl P, Stewart GS, Taylor AM, Morgan IM, Dobner T, Grand RJ, Turnell AS. Adenovirus 12 E4orf6 inhibits ATR activation by promoting TOPBP1 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 6;107(27):12251-56. Epub 2010 Jun 21.

Blomberg I, Hoffmann I. Ectopic Expression of Cdc25A Accelerates the G1/S Transition and Leads to Premature Activation of Cyclin E- and Cyclin A-Dependent Kinases. *Mol and Cell Biol*. 1999;19(9):6183-94.

Bolderson E, Richard DJ, Zhou BB, Khanna KK. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6314-20. Epub 2009 Oct 6. Review.

Bootman MD, Fearnley C, Smyrniak I, MacDonald F, Roderick HL. An update on nuclear calcium signalling. *J Cell Sci*. 2009 Jul 15;122(Pt 14):2337-50. Review.

Bornholdt S. Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *J R Soc Interface*. 2008 Aug 6;5 Suppl 1:S85-94. Review.

Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magné N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res*. 2001 Nov 1;61(21):7785-91.

Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:185-91. Epub 2006 Feb 17.

Breitling R, Gilbert D, Heiner M, Orton R. A structured approach for the engineering of biochemical network models, illustrated for signalling pathways. *Brief Bioinform*. 2008 Sep;9(5):404-21. Epub 2008 Jun 23. Review.

Brooks CL, Li M, Gu W. Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22804-15. Epub 2007 May 11.

Butcher JC. *Numerical Methods for Ordinary Differential Equations*. Wiley, Chichester, UK, 2003.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Sep;8(9):729-40.

Cann KL, Hicks GG. Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol.* 2007;85(6):663–74.

Cannell IG, Kong YW, Johnston SJ, Chen ML, Collins HM, Dobbyn HC, Elia A, Kress TR, Dickens M, Clemens MJ, Heery DM, Gaestel M, Eilers M, Willis AE, Bushell M. p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 23;107(12):5375-80. Epub 2010 Mar 8.

Carson JP, Zhang N, Frampton GM, Gerry NP, Lenburg ME, Christman MF. Pharmacogenomic identification of targets for adjuvant therapy with the topoisomerase poison camptothecin. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64(6):2096-104.

Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:369-413. Review.

Chaouiya C, Naldi A, Thieffry D. Logical modelling of gene regulatory networks with GINsim. *Methods Mol Biol.* 2012;804:463-79.

Chaouiya C, Remy E, Mossé B, Thieffry D. Qualitative analysis of regulatory graphs: a computational tool based on a discrete formal framework. *Lect Notes Comput Inf Sci.* 2003 294:119–26.

Chen L, Gilkes DM, Pan Y, Lane WS, Chen J. ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J.* 2005 Oct 5;24(19):3411-22. Epub 2005 Sep 15.

Cheong R, Hoffmann A, Levchenko A. Understanding NF-kappaB signaling via mathematical modeling. *Mol Syst Biol.* 2008;4:192. Epub 2008 May 6.

Cho KH, Wolkenhauer O. Analysis and modelling of signal transduction pathways in systems biology. *Biochem Soc Trans.* 2003 Dec;31(Pt 6):1503-09.

Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):179-204. Review.

Clémenson C, Marsolier-Kergoat MC. DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery. *DNA Repair (Amst).* 2009 Sep 2;8(9):1101-09. Epub 2009 May 22. Review.

Cortez D, Ang Y, Quin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-Dependent Phosphorylation of Brca1 in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks. *Science.* 1999;286(5442):1162-66.

Cuenin S, Tinel A, Janssens S, Tschopp J. p53-induced protein with a death domain (PIDD) isoforms differentially activate nuclear factor-kappaB and caspase-2 in response to genotoxic stress. *Oncogene.* 2008;27(3):387-96. Epub 2007 16.

d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(7):512–22. Review.

Dai Y, Liu M, Tang W, DeSano J, Burstein E, Davis M, Pienta K, Lawrence T, Xu L. Molecularly targeted radiosensitization of human prostate cancer by modulating inhibitor of apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 1;14(23):7701-10.

Literaturverzeichnis

Dauth I, Krüger J, Hofmann TG. Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res.* 2007 Mar 1;67(5):2274-79.

Davidich M, Bornholdt S. Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. *PLoS One.* 2008 Feb 27;3(2):e1672.

de Beer EL, Bottone AE, Voest EE. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;415(1):1-11.

de Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004 May;19(3):169-85. Review.

de Jong H. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *J Comput Biol.* 2002;9(1):67-103. Review.

Deorukhkar A, Krishnan S. Targeting inflammatory pathways for tumor radiosensitization. *Biochem Pharmacol.* 2010 Dec 15;80(12):1904-14. Epub 2010 Jun 30. Review.

Deweese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* 2009 Feb;37(3):738-48. Epub 2008 Nov 28. Review.

Dhingra V, Gupta M, Andacht T, Fu ZF. New frontiers in proteomics research: a perspective. *Int J Pharm.* 2005 Aug 11;299(1-2):1-18. Review.

DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1295-1304.

Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipek C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC, Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA, Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1069-75.

Dong F, Soubeyrand S, Haché RJ. Activation of PARP-1 in response to bleomycin depends on the Ku antigen and protein phosphatase 5. *Oncogene.* 2010 Apr 8;29(14):2093-2103. Epub 2010 Jan 25.

Dong YB, Yang HL, McMasters KM. E2F-1 overexpression sensitizes colorectal cancer cells to camptothecin. *Cancer Gene Ther.* 2003;10(3):168-78.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):33-42.

Dupré A, Boyer-Chatenet L, Gautier J. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(5):451-57. Epub 2006 Apr 23.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. *Cell*. 1993;75(4):817-25.

Eungdamrong NJ, Iyengar R. Modeling cell signaling networks. *Biol Cell*. 2004 Jun;96(5):355-62. Review.

Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK. BRCA1-BARD1 complexes are required for p53^{Ser-15} phosphorylation and a G₁/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem*. 2004;279(30):31251-58. Epub 2004 May 24.

Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001;410(6830):842-47.

Fandy TE, Shankar S, Srivastava RK. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2008 Jun 30;7:60.

Fauré A, Naldi A, Chaouiya C, Thieffry D. Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics*. 2006 Jul 15;22(14):e124-31.

Fauré A, Thieffry D. Logical modelling of cell cycle control in eukaryotes: a comparative study. *Mol Biosyst*. 2009 Dec;5(12):1569-81. Epub 2009 Sep 17. Review.

Feng J, Wakeman T, Yong S, Wu X, Kornbluth S, Wang XF. Protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of replication protein A is required for the repair of DNA breaks induced by replication stress. *Mol Cell Biol*. 2009 Nov;29(21):5696-709. Epub 2009 Aug 24.

Finkel T, Gutkind JS. Signal transduction and human disease. Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey, USA, 2003.

Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM, Appella E. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6048-53.

Flatten K, Dai NT, Vroman BT, Loegering D, Erlichman C, Karnitz LM, Kaufmann SH. The role of checkpoint kinase 1 in sensitivity to topoisomerase I poisons. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):14349-55. Epub 2005 Feb 7.

Foray N, Marot D, Randrianarison V, Venezia ND, Picard D, Perricaudet M, Favaudon V, Jeggo P. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. 2002. *Mol Cell Biol*. 22(12):4020-32.

Franke R, Müller M, Wundrack N, Gilles ED, Klamt S, Kähne T, Naumann M. Host-pathogen systems biology: Logical modelling of hepatocyte growth factor and *Helicobacter pylori* induced c-Met signal transduction. *BMC Syst Biol*. 2008;2:4.

Freeman AK, Monteiro AN. Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell Commun Signal*. 2010 Sep 22;8:27.

Fujimoto H, Onishi N, Kato N, Takekawa M, Xu XZ, Kosugi A, Kondo T, Imamura M, Oishi I, Yoda A, Minami Y. Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death Differ*. 2006 Jul;13(7):1170-80. Epub 2005 Nov 25.

Funahashi A, Tanimura N, Morohashi M, and Kitano H: CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *BIOSILICO* 2003, 1:159-62.

Gagneur J, Casari G. From molecular networks to qualitative cell behavior. *FEBS Lett.* 2005 Mar 21;579(8):1867-71. Review.

Gangadharan C, Thoh M, Manna SK. Late phase activation of nuclear transcription factor kappaB by doxorubicin is mediated by interleukin-8 and induction of apoptosis via FasL. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Apr;120(3):671-83. Epub 2009 Aug 2.

Garg A, Di Cara A, Xenarios I, Mendoza L, De Micheli G. Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks. *Bioinformatics.* 2008 Sep 1;24(17):1917-25. Epub 2008 Jul 9.

Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, Greenman CD, Dastur A, Lau KW, Greninger P, Thompson IR, Luo X, Soares J, Liu Q, Iorio F, Surdez D, Chen L, Milano RJ, Bignell GR, Tam AT, Davies H, Stevenson JA, Barthorpe S, Lutz SR, Kogera F, Lawrence K, McLaren-Douglas A, Mitropoulos X, Mironenko T, Thi H, Richardson L, Zhou W, Jewitt F, Zhang T, O'Brien P, Boisvert JL, Price S, Hur W, Yang W, Deng X, Butler A, Choi HG, Chang JW, Baselga J, Stamenkovic I, Engelman JA, Sharma SV, Delattre O, Saez-Rodriguez J, Gray NS, Settleman J, Futreal PA, Haber DA, Stratton MR, Ramaswamy S, McDermott U, Benes CH. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature.* 2012 Mar 28;483(7391):570-75. doi: 10.1038/nature11005.

Garrett MD, Collins I. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? *Trends Pharmacol Sci.* 2011 May;32(5):308-16. Epub 2011 Mar 30. Review.

Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK. Role for ATM in DNA Damage-induced Phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res.* 2000;60(12):3299-3304.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012 Mar 8;366(10):883-92.

Gilbert D, Fuss H, Gu X, Orton R, Robinson S, Vyshemirsky V, Kurth MJ, Downes CS, Dubitzky W. Computational methodologies for modelling, analysis and simulation of signalling networks. *Brief Bioinform.* 2006 Dec;7(4):339-53. Epub 2006 Nov 20. Review.

Goldberg Z, Sionov RV, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, Oren M, Taya Y, Haupt Y. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J.* 2002;21(14):3715-27.

Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK. Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 2004 Nov 10;23(22):4451-61. Epub 2004 Oct 28.

Gudkov AV, Komarova EA. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):726-36. Review.

Guo CY, Brautigan DL, Larner JM. ATM-dependent dissociation of B55 regulatory subunit from nuclear PP2A-B55 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):4839-44. Epub 2001 Nov 26.

- Han Z, Wei W, Dunaway S, Darnowski JW, Calabresi P, Sedivy J, Hendrickson EA, Balan KV, Pantazis P, Wyche JH. Role of p21 in Apoptosis and Senescence of Human Colon Cancer Cells Treated with Camptothecin. *J Biol Chem*. 2002;277(19):17154-60. Epub 2002 Mar 4.
- Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007 Dec 14; 28(5):739-45.
- Hayden MS, Gosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Mar;8(3):193-204. Review.
- Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem*. 2005 Jan 14;280(2):1186-92.
- Hinz M, Stilmann M, Arslan SÇ, Khanna KK, Dittmar G, Scheidereit C. A cytoplasmic ATM-TRAF6-clAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-κB activation. *Mol Cell*. 2010 Oct 8;40(1):63-74.
- Hlavacek WS, Faeder JR, Blinov ML, Posner RG, Hucka M, Fontana W. Rules for modeling signal-transduction systems. *Sci STKE*. 2006 Jul 18;2006(344):re6. Review.
- Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009 Oct 8;361(15):1475-85. Review. Erratum in: *N Engl J Med*. 2009 Nov 5;361(19):1914.
- Huang S. Genomics, complexity and drug discovery: insights from Boolean network models of cellular regulation. *Pharmacogenomics*. 2001 Aug;2(3):203-22. Review.
- Huang S, Ingber DE. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res*. 2000 Nov 25;261(1):91-103. Review.
- Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*. 2003;115(5):565-76.
- Hur GM, Lewis J, Yang Q, Lin Y, Nakano H, Nedospasov S, Liu ZG. The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF-kappa B activation. *Genes Dev*. 2003 Apr 1;17(7):873-82. Epub 2003 Mar 21.
- Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2003;21:271-276.
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009 Oct 22;461(7267):1071-78. Review.
- Janssens S, Tinel A, Lippens S, Tschopp J. PIDD Mediates NF-κB Activation in Response to DNA Damage. *Cell*. 2005;123(6):1079-92.
- Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):773-84. Review.

Literaturverzeichnis

Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2006 Jan;8(1):37-45. Epub 2005 Dec 4.

Jiang H, Reinhardt HC, Bartkova J, Tommiska J, Blomqvist C, Nevanlinna H, Bartek J, Yaffe MB, Hemann MT. The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes Dev.* 2009 Aug 15;23(16):1895-1909. Epub 2009 Jul 16.

Jiang L, Sheikh MS, Huang Y. Decision Making by p53: Life versus Death. *Mol Cell Pharmacol.* 2010 Jan 1;2(2):69-77.

Jin HS, Lee DH, Kim DH, Chung JH, Lee SJ, Lee TH. cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* 2009 Mar 1;69(5):1782-91. Epub 2009 Feb 17.

Jin J, Ang XL, Ye X, Livingstone M, Harper JW. Differential Roles for Checkpoint Kinases in DNA Damage-dependent Degradation of the Cdc25A Protein Phosphatase. *J Biol Chem.* 2008. 283(28):19322-28. Epub 2008 May 13.

Jin S, Kalkum M, Overholtzer M, Stoffel A, Chait BT, Levine AJ. CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals. *Genes Dev.* 2003 Feb 1;17(3):359-67.

Jordan JD, Landau EM, Iyengar R. Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):193-200. Review.

Jorgensen TJ, Shiloh Y. The ATM gene and the radiobiology of ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol.* 1996 May;69(5):527-37. Review.

Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002 Mar;3(3):221-27.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):431-36. Review.

Kasowski M, Grubert F, Heffelfinger C, Hariharan M, Asabere A, Waszak SM, Habegger L, Rozowsky J, Shi M, Urban AE, Hong MY, Karczewski KJ, Huber W, Weissman SM, Gerstein MB, Korbel JO, Snyder M. Variation in transcription factor binding among humans. *Science.* 2010 Apr 9;328(5975):232-35. Epub 2010 Mar 18.

Kauffman SA. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J Theor Biol.* 1969 Mar;22(3):437-67.

Kemp MG, Akan Z, Yilmaz S, Grillo M, Smith-Roe SL, Kang TH, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK, Abraham RT, Sancar A, Unsal-Kaçmaz K. Tipin-replication protein A interaction mediates Chk1 phosphorylation by ATR in response to genotoxic stress. *J Biol Chem.* 2010 May 28;285(22):16562-71. Epub 2010 Mar 15.

Kenneth NS, Mudie S, Rocha S. IKK and NF-kappaB-mediated regulation of Claspin impacts on ATR checkpoint function. *EMBO J.* 2010 Sep 1;29(17):2966-78. Epub 2010 Jul 23.

Kestler HA, Wawra C, Kracher B, Kühl M. Network modeling of signal transduction: establishing the global view. *Bioessays.* 2008 Nov;30(11-12):1110-25. Review.

Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001;27(3):247–54.

Kim JM, Kakusho N, Yamada M, Kanoh Y, Takemoto N, Masai H. Cdc7 kinase mediates Claspin phosphorylation in DNA replication checkpoint. *Oncogene.* 2008 May 29;27(24):3475-82. Epub 2007 Dec 17.

Klamt S, Saez-Rodriguez J, Gilles ED. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC Syst Biol.* 2007 Jan 8;1:2.

Klamt S, Saez-Rodriguez J, Lindquist JA, Simeoni L, Gilles ED. A methodology for the structural and functional analysis of signaling and regulatory networks. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:56.

Klemm K, Bornholdt S. Stable and unstable attractors in Boolean networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2005 Nov;72(5 Pt 2):055101. Epub 2005 Nov 16.

Klipp E, Herwig R, Kowald A, Wierling C. *Systems Biology in Practice: Concepts, Implementation and Application* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2005

Koch M, Broom BM, Subramanian D. Learning robust cell signalling models from high throughput proteomic data. *Int J Bioinform Res Appl.* 2009;5(3):241-53.

Kostanová-Poliaková D, Sabová L. Anti-apoptotic proteins-targets for chemosensitization of tumor cells and cancer treatment. *Neoplasma.* 2005;52(6):441-49. Review.

Kreeger PK, Lauffenburger DA. Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis.* 2010 Jan;31(1):2-8. Epub 2009 Oct 27. Review.

Kumar S. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat Rev Cancer.* 2009 Dec;9(12):897-903. Epub 2009 Nov 5.

Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2004 Dec 17;279(51):53272-81. Epub 2004 Oct 14.

Lafarga V, Cuadrado A, Lopez de Silanes I, Bengoechea R, Fernandez-Capetillo O, Nebreda AR. p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol Cell Biol.* 2009 Aug;29(16):4341-51. Epub 2009 Jun 15.

Lakin ND, Hann SP, Jackson SP. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene.* 1999;18(27):3989-95.

Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Oct;9(10):759-69. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Dec;9(12). doi: 10.1038/nrm2514.

Lee MH, Mabb AM, Gill GB, Yeh ET, Miyamoto S. NF- κ B Induction of the SUMO Protease SENP2: A Negative Feedback Loop to Attenuate Cell Survival Response to Genotoxic Stress. *Mol Cell.* 2011 Jul 22;43(2):180-91.

Leung-Pineda V, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol Cell Biol.* 2006 Oct;26(20):7529-38. Epub 2006 Aug 5.

Literaturverzeichnis

Lev Bar-Or R, Maya R, Segel LA, Alon U, Levine AJ, Oren M. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 10;97(21):11250-55.

Li DW, Liu JP, Schmid PC, Schlosser R, Feng H, Liu WB, Yan Q, Gong L, Sun SM, Deng M, Liu Y. Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. *Oncogene*. 2006a May 18;25(21):3006-22.

Li HY, Liu H, Wang CH, Zhang JY, Man JH, Gao YF, Zhang PJ, Li WH, Zhao J, Pan X, Zhou T, Gong WL, Li AL, Zhang XM. Deactivation of the kinase IKK by CUEDC2 through recruitment of the phosphatase PP1. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):533-41. Epub 2008 Mar 23.

Li N, Karin M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(22):13012-17.

Li Y, Cucinotta FA. Modeling non-homologous end joining. *J Theor Biol*. 2011 Aug 21;283(1):122-35. Epub 2011 May 24.

Li Z, Hosoi Y, Cai K, Tanno Y, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, Nakagawa K, Miyagawa K. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006b Mar 10;341(2):363-68. Epub 2006 Jan 18.

Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JH, Kastan MB. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*. 2000;404(6778):613-17.

Liu S, Bekker-Jensen S, Mailand N, Lukas C, Bartek J, Lukas J. Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation. *Mol Cell Biol*. 2006 Aug;26(16):6056-64.

Löbrich M, Rydberg B, Cooper PK. Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(26):12050-54.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):776-81. Epub 2003 Jan 27. Review.

Loewer A, Batchelor E, Gaglia G, Lahav G. Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells. *Cell*. 2010 Jul 9;142(1):89-100.

Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response in cancer and therapy. *Nature*. 2012 Jan 19;481 (7381):287-94. Review.

Lu Z. PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. *Database (Oxford)*. 2011 Jan 18;2011:baq036. Print 2011. Review.

Ma CX, Janetka JW, Piwnica-Worms H. Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics. *Trends Mol Med*. 2011 Feb;17(2):88-96. Epub 2010 Nov 17. Review.

Ma Y, Wang M, Li N, Wu R, Wang X. Bleomycin-induced nuclear factor-kappaB activation in human bronchial epithelial cells involves the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Toxicol Lett*. 2009;187(3):194-200.

Mabb AM, Wuerzberger-Davis SM, Miyamoto S. PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol.* 2006;8(9):986-93. Epub 2006 Aug 13.

Mäkiniemi M, Hillukkala T, Tuusa J, Reini K, Vaara M, Huang D, Pospiech H, Majuri I, Westerling T, Mäkelä TP, Syväoja JE. BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem.* 2001 Aug 10;276(32):30399-30406. Epub 2001 Jun 6.

Mangan S, Alon U. Structure and function of the feed-forward loop network motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):11980-85. Epub 2003 Oct 6.

Mani KM, Lefebvre C, Wang K, Lim WK, Basso K, Dalla-Favera R, Califano A. A systems biology approach to prediction of oncogenes and molecular perturbation targets in B-cell lymphomas. *Mol Syst Biol.* 2008;4:169. Epub 2008 Feb 12.

Martin SE, Wu ZH, Gehlhaus K, Jones TL, Zhang YW, Guha R, Miyamoto S, Pommier Y, Caplen NJ. RNAi screening identifies TAK1 as a potential target for the enhanced efficacy of topoisomerase inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011 Oct;11(8):976-86.

Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):439-44. Epub 2001 Oct 15.

Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1805(1):105-17. Epub 2009 Nov 18. Review.

Maslov S, Sneppen K, Alon U. Correlation profiles and motifs in complex networks. In: Bornholdt S and Schuster HG, Editors. *Handbook of Graphs and Networks: From the Genome to the Internet.* Wiley-VCH Berlin. 2003:168-98.

Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science.* 1998;282(5395):1893-97.

McAdams HH, Arkin A. Stochastic mechanisms in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 4;94(3):814-19.

McCool KW, Miyamoto S. DNA damage-dependent NF-κB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev.* 2012 Mar;246(1):311-26. Review.

McDermott U, Settleman J. Personalized cancer therapy with selective kinase inhibitors: an emerging paradigm in medical oncology. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 20;27(33):5650-59. Epub 2009 Oct 26. Review.

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, Hollestelle A, Houben M, Crepin E, van Veghel-Plandsoen M, Elstrodt F, van Duijn C, Bartels C, Meijers C, Schutte M, McGuffog L, Thompson D, Easton D, Sodha N, Seal S, Barfoot R, Mangion J, Chang-Claude J, Eccles D, Eeles R, Evans DG, Houlston R, Murday V, Narod S, Peretz T, Peto J, Phelan C, Zhang HX, Szabo C, Devilee P, Goldgar D, Futreal PA, Nathanson KL, Weber B, Rahman N, Stratton MR; CHEK2-Breast Cancer Consortium. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet.* 2002 May;31(1):55-59. Epub 2002 Apr 22.

Literaturverzeichnis

- Melchionna R, Chen XB, Blasiani A, McGowan CH. Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol.* 2000;2(10):762-65.
- Melisi D, Xia Q, Paradiso G, Ling J, Moccia T, Carbone C, Budillon A, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Modulation of Pancreatic Cancer Chemoresistance by Inhibition of TAK1. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1–15.
- Mendelson E: Schaum's outline of Boolean algebra and switching circuits. McGraw-Hill, New York; 1970.
- Meulmeester E, Pereg Y, Shiloh Y, Jochemsen AG. ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle.* 2005 Sep;4(9):1166-70. Epub 2005 Sep 29. Review.
- Milo R, Shen-Orr S, Itzkovitz S, Kashtan N, Chklovskii D, Alon U. Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science.* 2002 Oct 25;298(5594):824-27.
- Morgan MA, Parsels LA, Zhao L, Parsels JD, Davis MA, Hassan MC, Arumugarajah S, Hylander-Gans L, Morosini D, Simeone DM, Canman CE, Normolle DP, Zabludoff SD, Maybaum J, Lawrence TS. Mechanism of radiosensitization by the Chk1/2 inhibitor AZD7762 involves abrogation of the G2 checkpoint and inhibition of homologous recombinational DNA repair. *Cancer Res.* 2010 Jun 15;70(12):4972-81. Epub 2010 May 25.
- Morris MK, Saez-Rodriguez J, Sorger PK, Lauffenburger DA. Logic-based models for the analysis of cell signaling networks. *Biochemistry.* 2010 Apr 20;49(15):3216-24. Review.
- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2005 Apr;5(4):297-309. Review.
- Naldi A, Berenguier D, Fauré A, Lopez F, Thieffry D, Chaouiya C. Logical modelling of regulatory networks with GINsim 2.3. *Biosystems.* 2009 Aug;97(2):134-39. Epub 2009 May 6.
- Naldi A, Carneiro J, Chaouiya C, Thieffry D. Diversity and plasticity of Th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput Biol.* 2010 Sep 2;6(9):e1000912.
- Naldi A, Remy E, Thieffry D, Chaouiya C. Dynamically consistent reduction of logical regulatory graphs. *Theor Comp Sci.* 2011 May 6;412(21):2207-18.
- Naldi A, Thieffry D, Chaouiya C. Decision diagrams for the representation of logical models of regulatory networks. *Lecture Notes Comput. Sci.* 2007 (4695):233–47.
- Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J.* 2011 Jun 15;436(3):527-36. Review.
- Neet KE. Cooperativity in enzyme function: equilibrium and kinetic aspects. *Methods Enzymol.* 1995;249:519-67. Review.
- Niu J, Shi Y, Iwai K, Wu ZH. LUBAC regulates NF- κ B activation upon genotoxic stress by promoting linear ubiquitination of NEMO. *EMBO J.* 2011 Aug 2;30(18):3741-53.
- O'Dea EL, Kearns JD, Hoffmann A. UV as an amplifier rather than inducer of NF-kappaB activity. *Mol Cell.* 2008 Jun 6;30(5):632-41.

O'Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):1227-35. Review.

Ogrunc M, d'Adda di Fagagna F. Never-ageing cellular senescence. *Eur J Cancer*. 2011 Jul;47(11):1616-22. Epub 2011 May 9. Review.

Orlowski RZ, Baldwin Jr AS. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med*. 2002;8(8):385-89.

Ou YH, Chung PH, Sun TP, Shieh SY. p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Mol Biol Cell*. 2005 Apr;16(4):1684-95. Epub 2005 Jan 19.

Pan Y, Chen J. MDM2 Promotes Ubiquitination and Degradation of MDMX. *Mol Cell Biol*. 2003;23(15):5113-21.

Panta GR, Kaur S, Cavin LG, Cortés ML, Mercurio F, Lothstein L, Sweatman TW, Israel M, Arsura M. ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2004;24(5):1823-35.

Papin JA, Hunter T, Palsson BO, Subramaniam S. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):99-111. Review.

Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 1995 Feb 16;373(6515):573-80. Review.

Pearl, J. Bayesian Networks: A Model of Self-Activated Memory for Evidential Reasoning (UCLA Technical Report CSD-850017). Proceedings of the 7th Conference of the Cognitive Science Society, University of California, Irvine, CA. 1985. pp. 329-34.

Pedram A, Razandi M, Evinger AJ, Lee E, Levin ER. Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair. *Mol Biol Cell*. 2009 Jul;20(14):3374-89. Epub 2009 May 28.

Pe'er D. Bayesian network analysis of signaling networks: a primer. *Sci STKE*. 2005 Apr 26;2005(281):pl4. Review.

Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1501-05.

Pereg Y, Shkedy D, de Graaf P, Meulmeester E, Edelson-Averbukh M, Salek M, Biton S, Teunisse AF, Lehmann WD, Jochemsen AG, Shiloh Y. Phosphorylation of Hdmx mediates its Hdm2- and ATM-dependent degradation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(14):5056-61. Epub 2005 May 23.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):49-62. Review.

Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6717-30. Review.

Literaturverzeichnis

Petermann E, Helleday T, Caldecott KW. Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell*. 2008 Jun;19(6):2373-78. Epub 2008 Mar 19.

Petermann E, Woodcock M, Helleday T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 14;107(37):16090-95. Epub 2010 Aug 30.

Philippi N, Walter D, Schlatter R, Ferreira K, Ederer M, Sawodny O, Timmer J, Borner C, Dandekar T. Modeling system states in liver cells: Survival, apoptosis and their modifications in response to viral infection. *BMC Syst Biol*. 2009;3(1):97.

Phillips A, Teunisse A, Lam S, Lodder K, Darley M, Emaduddin M, Wolf A, Richter J, de Lange J, Verlaan-de Vries M, Lenos K, Böhnke A, Bartel F, Blaydes JP, Jochemsen AG. HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *J Biol Chem*. 2010 Sep 17;285(38):29111-27. Epub 2010 Jul 20.

Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(10):789-802.

Portugal J, Mansilla S, Bataller M. Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Curr Pharm Des*. 2010 Jan;16(1):69-78. Review.

Povirk LF. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res*. 1996;355(1-2):71-89.

Radiation genes database: <http://t.caspur.it/RadioGenes>

Rai R, Peng G, Li K, Lin SY. DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer Genomics Proteomics*. 2007 Mar-Apr;4(2):99-106. Review.

Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*. 2007 Feb;11(2):175-89.

Reinhardt HC, Jiang H, Hemann MT, Yaffe MB. Exploiting synthetic lethal interactions for targeted cancer therapy. *Cell Cycle*. 2009 Oct 1;8(19):3112-19. Review.

Renner F, Dorta, RM, Schmitz L. SUMOylation-dependent localization of IKKepsilon in PML nuclear bodies is essential for protecting against DNA damage-triggered cell death. *Mol Cell*. 2010 Feb 26;37(4):503-15.

Ribeiro AS. Stochastic and delayed stochastic models of gene expression and regulation. *Math Biosci*. 2010 Jan;223(1):1-11. Epub 2009 Oct 31. Review.

Rinaldo C, Prodosmo A, Mancini F, Iacovelli S, Sacchi A, Moretti F, Soddu S. MDM2-Regulated Degradation of HIPK2 Prevents p53Ser46 Phosphorylation and DNA Damage-Induced Apoptosis. *Mol Cell*. 2007 Mar 9;25(5):739-50.

Robison JG, Bissler JJ, Dixon K. Replication Protein A is Required for Etoposide-Induced Assembly of MRE11/RAD50/NBS1 Complex Repair Foci. *Cell Cycle*. 2007;6(19):2408-16. Epub 2007 Jul 20.

Rocha S, Martin AM, Meek DW, Perkins ND. p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*. 2003;23(13):4713-27.

Romano MF, Avellino R, Petrella A, Bisogni R, Romano S, Venuta S. Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur J Cancer*. 2004 Dec;40(18):2829-36.

Ryll A, Samaga R, Schaper F, Alexopoulos LG, Klamt S. Large-scale network models of IL-1 and IL-6 signalling and their hepatocellular specification. *Mol Biosyst*. 2011 Dec;7(12):3253-70. Epub 2011 Oct 3.

Sachs K, Perez O, Pe'er D, Lauffenburger DA, Nolan GP. Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data. *Science*. 2005 Apr 22;308(5721):523-29. Erratum in: *Science*. 2005 Aug 19;309(5738):1187.

Sahin Ö, Fröhlich H, Löbke C, Korf U, Burmester S, Majety M, Mattern M, Schupp I, Chaouiya C, Thieffry D, Poustka A, Wiemann S, Beissbarth T, Aert D: Modeling ERBB receptor-regulated G1/S transition to find novel targets for de novo trastuzumab resistance. *BMC Syst Biol* 2009, 3:1.

Saintigny Y, Delacôte F, Varès G, Petitot F, Lambert S, Aeverbeck D, Lopez BS. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J*. 2001 Jul 16;20(14):3861-70.

Saldívar JC, Shibata H, Huebner K. Pathology and biology associated with the fragile FHIT gene and gene product. *J Cell Biochem*. 2010 Apr 1;109(5):858-65. Review.

Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res*. 1998 Oct 1;58(19):4375-82.

Sarkies P, Sale JE. Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends Genet*. 2012 Mar;28(3):118-27. Epub 2012 Jan 5. Review.

Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *Zhejiang Univ Sci B*. 2007 Jun;8(6):377-97. Review.

Schouten GJ, Vertegaal AC, Whiteside ST, Israël A, Toebes M, Dorsman JC, van der Eb AJ, Zantema A. IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase. *EMBO J*. 1997 Jun 2;16(11):3133-44.

Schreiber F, Schwöbbermeyer H. MAVisto: a tool for the exploration of network motifs. *Bioinformatics*. 2005 Sep 1;21(17):3572-74. Epub 2005 Jul 14.

Schuijjer M, Berns EM. TP53 and ovarian cancer. *Hum Mutat*. 2003 Mar;21(3):285-91. Review.

Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 Nov;29(Pt 6):684-88. Review.

Schwöbbermeyer H, Wünschiers R. MAVisto: a tool for biological network motif analysis. *Methods Mol Biol*. 2012;804:263-80.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):235-46. Review.

Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*. 2000 Feb 1;14(3):289-300. Erratum in: *Genes Dev* 2000 Mar 15;14(6):750.

Shimada M, Nakanishi M. DNA damage checkpoints and cancer. *J Mol Histol*. 2006;37(5 7):253–60.

Shreeram S, Demidov ON, Hee WK, Yamaguchi H, Onishi N, Kek C, Timofeev ON, Dudgeon C, Fornace AJ, Anderson CW, Minami Y, Appella E, Bulavin DV. Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol Cell*. 2006 Sep 1;23(5):757-64.

Sombroek D, Hofmann TG. How cells switch HIPK2 on and off. *Cell Death Differ*. 2009 Feb;16(2):187-94. Epub 2008 Oct 31. Review.

Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, Zhang Z, Hegde R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):31469-72. Epub 2003 Jun 30.

Stark J, Callard R, Hubank M. From the top down: towards a predictive biology of signalling networks. *Trends Biotech*. 2003;21:290–93.

Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. 2003;5(5):401–09.

Stilmann M, Hinz M, Arslan SC, Zimmer A, Schreiber V, Scheidereit C. A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced I κ B kinase activation. *Mol Cell*. 2009;36(3):365-78.

Strozyk E, Pöppelmann B, Schwarz T, Kulms D. Differential effects of NF- κ B on apoptosis induced by DNA damage determines the final outcome. *Oncogene*. 2006;25(47):6239-51. Epub 2006 May 15.

Strumberg D, Pilon AA, Smith M, Hickey R, Malkas L, Pommier Y. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol*. 2000 Jun;20(11):3977-87.

Stuart SA, Wang JY. Ionizing radiation induces ATM-independent degradation of p21Cip1 in transformed cells. *J Biol Chem*. 2009 May 29;284(22):15061-70. Epub 2009 Mar 30.

Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*. 1988 Aug 25;334(6184):715-18.

Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem*. 2002;277(15):12710-17. Epub 2002 Jan 30.

Tapia MA, González-Navarrete I, Dalmases A, Bosch M, Rodríguez-Fanjul V, Rolfe M, Ross JS, Mezquita J, Mezquita C, Bachs O, Gascón P, Rojo F, Perona R, Rovira A, Albanell J. Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. *Cell Cycle*. 2007 Sep 15;6(18): 2284-92. Epub 2007 Jul 10.

- Tentner AR, Lee MJ, Ostheimer GJ, Samson LD, Lauffenburger DA, Yaffe MB. Combined experimental and computational analysis of DNA damage signaling reveals context-dependent roles for Erk in apoptosis and G1/S arrest after genotoxic stress. *Mol Syst Biol*. 2012 Jan 31;8:568. doi: 10.1038/msb.2012.1.
- The Tumor Gene Family of Databases: <http://www.tumor-gene.org/tgdf.html>, accessed October 2011.
- Thieffry D. Dynamical roles of biological regulatory circuits. *Brief Bioinform*. 2007 Jul;8(4):220-25. Epub 2007 Jul 11. Review.
- Thomas R, Thieffry D, Kaufman M. Dynamical behaviour of biological regulatory networks. I. Biological role of feedback loops and practical use of the concept of the loop-characteristic state. *Bull Math Biol*. 1995; 57:247–76.
- Thomas R. On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations. *Springer Ser Synergetics* 1981. 9: 180–93.
- Thomas R. Regulatory networks seen as asynchronous automata: A logical description. *J Theor Biol*. 1991 Nov 7;153(1):1-23.
- Tinel A, Eckert MJ, Logette E, Lippens S, Janssens S, Jaccard B, Quadroni M, Tschopp J. Regulation of PIDD auto-proteolysis and activity by the molecular chaperone Hsp90. *Cell Death Differ*. 2011 Mar;18(3):506-15. Epub 2010 Oct 22.
- Tinel A, Janssens S, Lippens S, Cuenin S, Logette E, Jaccard B, Quadroni M, Tschopp J. Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *EMBO J*. 2007;26(11):197-108. Epub 2006 Dec 7.
- Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 2004;304(5672):843-46. Epub 2004 Apr 8.
- Tofilon PJ, Camphausen K. Molecular targets for tumor radiosensitization. *Chem Rev*. 2009 Jul;109(7):2974-88. Review.
- Tournier L, Chaves M. Uncovering operational interactions in genetic networks using asynchronous Boolean dynamics. *J Theor Biol*. 2009;260(2):196-209.
- Tse AN, Rendahl KG, Sheikh T, Cheema H, Aardalen K, Embry M, Ma S, Moler EJ, Ni ZJ, Lopes de Menezes DE, Hibner B, Gesner TG, Schwartz GK. CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):591-602.
- Tse AN, Sheikh TN, Alan H, Chou TC, Schwartz GK. 90-kDa heat shock protein inhibition abrogates the topoisomerase I poison-induced G2/M checkpoint in p53-null tumor cells by depleting Chk1 and Wee1. *Mol Pharmacol*. 2009 Jan;75(1):124-33. Epub 2008 Sep 26.
- van Riel NA. Dynamic modelling and analysis of biochemical networks: mechanism-based models and model-based experiments. *Brief Bioinform*. 2006 Dec;7(4):364-74. Epub 2006 Nov 14. Review.
- Varnum JM, Baraniak J, Kaczmarek R, Stec WJ, Brenner C. Di-, tri- and tetra-5'-O-phosphorothioadenosyl substituted polyols as inhibitors of Fhit: Importance of the alpha-beta bridging oxygen and beta phosphorus replacement. *BMC Chem Biol*. 2001;1(1):3.

Literaturverzeichnis

- Vaughan S, Jat PS. Deciphering the role of nuclear factor- κ B in cellular senescence. *Aging* (Albany NY). 2011 Oct;3(10):913-19.
- Volcic M, Karl S, Baumann B, Salles D, Daniel P, Fulda S, Wiesmüller L. NF- κ B regulates DNA double-strand break repair in conjunction with BRCA1-CtIP complexes. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40(1):181-95. Epub 2011 Sep 9.
- Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413-31. Review.
- Wagner JM, Kaufmann SH. Prospects for the use of ATR inhibitors to treat cancer. *Pharmaceuticals*. 2010 Apr 28;3(5):1311-34. Review.
- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005 Dec 1;44(45):7342-72. Review.
- Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell*. 2007 Feb;11(2):103-05.
- Walters R, Kalb R, Gatei M, Kijas AW, Stumm M, Sobock A, Wieland B, Varon R, Lerenthal Y, Lavin MF, Schindler D, Dörk T. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet*. 2009 May;84(5):605-16. Epub 2009 Apr 30.
- Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr. NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1999 Sep;19(9):5923-29.
- Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Jun;3(6):430-40. Review.
- Wang XQ, Redpath JL, Fan ST, Stanbridge EJ. ATR dependent activation of Chk2. *J Cell Phys*. 2006;208:613–619.
- Waning DL, Lehman JA, Batuello CN, Mayo LD. c-Abl phosphorylation of Mdm2 facilitates Mdm2-Mdmx complex formation. *J Biol Chem*. 2011 Jan 7;286(1):216-22. Epub 2010 Nov 16.
- Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1988;35:95-125. Review.
- Wilkinson DJ. Bayesian methods in bioinformatics and computational systems biology. *Brief Bioinform*. 2007 Mar;8(2):109-16. Epub 2007 Apr 12. Review.
- Wittmann DM, Krumsiek J, Saez-Rodriguez J, Lauffenburger DA, Klamt S, Theis FJ. Transforming Boolean models to continuous models: methodology and application to T-cell receptor signaling. *BMC Syst Biol*. 2009 Sep 28;3:98.
- Wu ZH, Miyamoto S. Many faces of NF- κ B signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med*. 2007;85(11):1187-1202. Epub 2007 Jul 3.
- Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular Linkage Between the Kinase ATM and NF- κ B Signaling in Response to Genotoxic Stimuli. *Science*. 2006;311(5764):1141-46.

Wu ZH, Wong ET, Shi Y, Niu J, Chen Z, Miyamoto S, Tergaonkar V. ATM- and NEMO-dependent ELKS ubiquitination coordinates TAK1-mediated IKK activation in response to genotoxic stress. *Mol Cell*. 2010 Oct 8;40(1):75-86.

Xiao Y. A tutorial on analysis and simulation of boolean gene regulatory network models. *Curr Genomics*. 2009 Nov;10(7):511-25.

Xu Y, Fang F, St Clair DK, Sompol P, Josson S, St Clair WH. SN52, a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, blocks nuclear import of RelB:p52 dimer and sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(8):2367-76.

Yang J, McEachern D, Li W, Davis MA, Li H, Morgan MA, Bai L, Sebolt JT, Sun H, Lawrence TS, Wang S, Sun Y. Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases. *Mol Cancer Ther*. 2011b Apr;10(4):658-69. Epub 2011 Jan 31.

Yang S, Kuo C, Bisi JE, Kim MK. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol*. 2002 Nov;4(11):865-70.

Yang Y, Xia F, Hermance N, Mabb A, Simonson S, Morrissey S, Gandhi P, Munson M, Miyamoto S, Kelliher MA. A cytosolic ATM/NEMO/RIP1 complex recruits TAK1 to mediate the NF- κ B and p38 MAP kinase/MAPKAP-2 responses to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2011a Jul;31(14):2774-86. Epub 2011 May 23.

Yu J, Wang P, Ming L, Wood MA, Zhang L. SMAC/Diablo mediates the proapoptotic function of PUMA by regulating PUMA-induced mitochondrial events. *Oncogene*. 2007 Jun 21;26(29):4189-98. Epub 2007 Jan 22.

Yutori H, Semba S, Komori T, Yokozaki H. Restoration of fragile histidine triad expression restores Chk2 activity in response to ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2008 Mar;99(3):524-30. Epub 2007 Dec 27.

Zhang GF, Sadhukhan S, Tochtrop GP, Brunengraber H. Metabolomics, pathway regulation, and pathway discovery. *J Biol Chem*. 2011a Jul 8;286(27):23631-35. Epub 2011 May 12. Review.

Zhang J, Bao S, Furumai R, Kucera KS, Ali A, Dean NM, Wang XF. Protein phosphatase 5 is required for ATR-mediated checkpoint activation. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(22):9910-19.

Zhang XP, Liu F, Wang W. Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011b May 31;108(22):8990-95. Epub 2011 May 16.

Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001;21(13):4129-39.

Zhao J, Grant SF. Advances in whole genome sequencing technology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Feb 1;12(2):293-305. Review.

Zhao Y, Ricci PF. Modeling Dose-response at Low Dose: A Systems Biology Approach for Ionization Radiation. *Dose Response*. 2010 Mar 18;8(4):456-77.

Zhou BB, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer*. 2004 Mar;4(3):216-25. Review.

Literaturverzeichnis

Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*. 2003;300(5625):1542-48.

10. Anhang

Anhang 1: Logische Funktionen des Modells

Logische Funktion	Zeitskalenwert	Erläuterung und bibliographische Referenzen
1. camptothecin · topoisomerasel* → DNA SSBs	1	Camptothecin erzeugt durch Inhibition von Topoisomerase I Einzelstrangbrüche (SSBs) (Pommier 2006).
2. SN38 · topoisomerasel* → DNA SSBs	1	SN38 erzeugt durch Inhibition von Topoisomerase I SSBs (Pommier 2006).
3. bleomycin → DNA DSBs early	1	Bleomycin erzeugt DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) (Povirk et al 1996). DSBs werden im Modell durch zwei regulatorische Komponenten repräsentiert: ‚DNA DSBs early‘ repräsentiert DSBs in der frühen Phase der DNA-Schadens-Antwort (Zeitskalenwert 1); in dieser Phase haben DSBs teilweise andere Funktionen als in der späteren Phase (‚DNA DSBs late‘ mit den Zeitskalenwerten 2 und 3).
4. HU → DNA DSBs early	1	Hydroxyurea blockiert DNA-Replikationsgabeln, was zu DSBs führt (Feng et al 2009, Saintigny et al 2001).
5. IR → DNA DSBs early	1	Ionisierende Strahlung verursacht vorwiegend DSBs (Ward et al 1988, Löbrich et al 1995).
6. daunomycin · topoisomerasell* → DNA DSBs early	1	Daunomycin (Daunorubicin) erzeugt DSBs durch Inhibition von Topoisomerasen II (Andoh und Ishida 1998).
7. doxorubicin · topoisomerasell* → DNA DSBs early	1	Doxorubicin (Adriamycin) erzeugt DSBs durch Inhibition von Topoisomerasen II (de Beer et al 2001).
8. VP16 · topoisomerasell* → DNA DSBs early	1	VP16 (Etoposid) erzeugt DSBs vorrangig durch Inhibition von Topoisomerasen II (Baldwin und Osheroff 2005).
9. DNA SSBs → DNA DSBs early	1	Durch DNA-Replikation können SSBs in DSBs umgewandelt werden (Strumberg et al 2000, Jackson und Bartek 2009).
10. DNA DSBs early → DNA DSBs late	2	Siehe Erläuterung zu ‚DNA DSBs early‘ und ‚DNA DSBs late‘ für Funktion 3.
11. DNA DSBs early → Ku	1	Das Dimer Ku wird durch Bindung an freiliegende Enden von DNA an DSBs aktiviert (Dong et al 2010).
12. Ku · PP5* → PARP1-PAR	1	Ku stimuliert die Poly-ADP-Ribosylierung von PARP1; das erfordert die Dephosphorylierung von PARP1 durch PP5 (Dong et al 2010).
13. !DNA SSBs · !DNA DSBs early → PP2A-Bx	1	PP2A-Bx („Bx“ kennzeichnet die unbekannte Untereinheit B des Komplexes PP2A) ist in Abwesenheit von DNA-Schäden aktiv, aber inaktiv in der frühen Phase der Antwort auf SSBs oder DSBs (Feng et al 2009, Leung-Pineda al 2006); vergleiche logische Funktion 77.
14. DNA SSBs · TopBP1* · !PP2A-Bx · PP5* → RPA-P-ATR-ATRIP-P	1	Die Komplexe RPA und ATR-ATRIP binden an freiliegende Enden von DNA an SSBs (Zou und Elledge 2003, Zhang et al 2005); dies sowie die Aktivität von ATR ist von der Phosphatase-Aktivität von PP5 abhängig (Zhang et al 2005), die Aktivität von ATR ist zudem von TopBP1 abhängig (Liu et al 2006, Blackford et al 2010); in der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort wird RPA an Threonin 21 und Serin 33 durch PP2A-Bx dephosphoryliert, was zur Inaktivierung von ATR führt (Feng et al 2009).
15. DNA SSBs → Cdc7	1	SSBs führen zur Aktivierung von Cdc7 (Kim et al 2008).
16. DNA DSBs early → Cdc7	1	DSBs führen zur Aktivierung von Cdc7 (Kim et al 2008).
17. nuclear c-Rel · Cdc7 → claspin-P	1	c-Rel wird konstitutiv exprimiert (Xu et al 2008, Radiation Genes Database); c-Rel wiederum vermittelt die konstitutive Expression von Claspin (Kenneth et al 2010); Cdc7 aktiviert Claspin durch Phosphorylierung (Kim et al 2008).
18. RPA-P-ATR-ATRIP-P · claspin-P · Timeless-Tipin* · !PP2A-Bx · Hsp90* → Chk1-P	1	Abhängig von Claspin und vom Komplex Timeless-Tipin wird Chk1 an Serin 296, 317 und 345 durch ATR phosphoryliert (Kim et al 2008, Adams et al 2006, Zhao et al 2001, Petermann et al 2008, Pedram et al 2009, Kemp et al 2010); PP2A-Bx deaktiviert Chk1 durch Dephosphorylierung von Serin 317 und 345 (und möglicherweise weiteren Aminosäureresten) (Leung-Pineda et al 2006); Hsp90 stabilisiert Chk1 (Arlander et al 2003, Tse et al 2009).
19. RPA-P-ATR-ATRIP-P · FHIT* · !Wip1 → Chk2-P	1	ATR phosphoryliert Chk2 an Threonin 68 (Wang et al 2006, Helt et al 2005); dies ist abhängig von FHIT (Yutori et al 2008); Wip1 deaktiviert Chk2 durch Dephosphorylierung von Threonin 68 (Fujimoto et al 2006).
20. 2 !ATM-P · !RPA-P-ATR-ATRIP-P · !Chk1-P · !Chk2-P → PP1	1	PP1 dephosphoryliert p53 konstitutiv, was dessen transkriptionelle Aktivität senkt; in der DNA-Schadens-Antwort aktivierte Kinasen interagieren mit p53 und verdrängen PP1 temporär (Li et al 2006a).
21. In CNA: DNA DSBs early · MRN* · PP5* · !Wip1 →	1	Der MRN-Komplex fördert nach Bindung an DSBs-Enden die

Anhang

ATM-P In <i>GINsim</i> : DNA DSBs early · MRN* · PP5* · PP2A-B55 · !Wip1 → ATM-P		Autophosphorylierung von ATM an Serin 1981 (Bakkenist und Kastan 2003, Dupré et al 2006, Robinson et al 2007); dieser Prozess wird durch PP5 unterstützt (Ali et al 2004). ATM wird an Serin 1981 hauptsächlich von der Phosphatase Wip1 dephosphoryliert (Shreeram et al 2006).
22. !ATM-P → PP2A-B55	1	DSBs führen zur Inaktivierung des Phosphatase-Komplexes PP2A-B55 (PP2A mit der B-Untereinheit ,B55') durch Dissoziation; dies ist von der Kinaseaktivität von ATM abhängig (logische Funktion 22); diese Inaktivierung von PP2A-B55 führt wiederum zu erhöhter Aktivität von ATM. ATM und PP2A-B55 hemmen sich gegenseitig (Guo et al 2002, Goodarzi et al 2004, Freeman und Monteiro 2010). Erklärt werden könnte dieser Sachverhalt durch eine von DSBs induzierte schwache Aktivität von ATM (Aktivitätszustand 1) (logische Funktion 21); diese wiederum führt zur Inaktivierung von PP2A-B55 (logische Funktion 22). Nun könnte die Anwesenheit von DSBs bei gleichzeitiger Abwesenheit des ATM-Inhibitors PP2A-B55 zur vollen Aktivität (Aktivitätszustand 2) von ATM führen (logische Funktion 23). Wie beobachtet, wird PP2A-B55 in der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort, jedoch noch vor dem Abschluss der Reparatur der DNA (zum Zeitskalenwert 2) erneut aktiv (Guo et al 2002, Goodarzi et al 2004). Im Modell resultiert diese späte Aktivierung von PP2A-B55 aus der durch Wip1 vermittelten Deaktivierung von ATM, was wiederum die Aktivierung von PP2A-B55 bewirkt (logische Funktionen 21 und 23). Die logische Funktion 21 enthält PP2A-B55 nur im Modell in <i>GINsim</i> , nicht aber im Modell in <i>CNA</i> , da die Funktionsweisen der diesen Computerprogrammen zugrunde liegenden Algorithmen unterschiedlich sind.
23. DNA DSBs early · MRN* · PP5* · !PP2A-B55 · !Wip1 → 2 ATM-P	1	ATM phosphoryliert Nbs1, eine Untereinheit des MRN-Komplexes, an Serin 343 (Lim et al 2000, Kurz et al 2004). Diese Interaktion ist nicht im <i>GINsim</i> -Modell enthalten, da sie weder Bestandteil von FFLs noch von FLs ist und keine Auswirkungen auf die Attraktoren des Modells hat.
24. 2 ATM-P · MRN* → MRN-P	1	ATM phosphoryliert Chk2 an Threonin 68 (Melchionna et al 2000); dies ist von FHIT abhängig (Yutori et al 2008); Wip1 dephosphoryliert Chk2 an Threonin 68 (Fujimoto et al 2006).
25. 2 ATM-P · FHIT* · !Wip1 → Chk2-P	1	ATM phosphoryliert c-Abl (Baskaran et al 1997, Foray et al 2002, Waning et al 2011).
26. 2 ATM-P → c-Abl-P	1	c-Abl-P vermittelt die Phosphorylierung von MDM2 an Serin 397, was zur Ubiquitylierung und schließlich zum Abbau von MDM2 führt (Goldberg et al 2002, Waning et al 2011).
27. !c-Abl-P → MDM2	1	MDMX wird sowohl durch Chk2 an Serin 342 und 367 als auch durch ATM an Serin 403 phosphoryliert; in beiden Fällen kommt es zur Ubiquitylierung und schließlich zum Abbau von MDMX (Chen et al 2005, Pan et al 2003, Pereg et al 2005). Davon unabhängig kann die Ubiquitin-E3-Ligase MDM2 den Abbau von MDMX durch dessen Ubiquitylierung vermitteln (Chen et al 2005, Pan et al 2003, Pereg et al 2005).
28. 2 !ATM-P · !Chk2-P · !MDM2 → MDMX	1	ATR phosphoryliert p53 an Serin 15 (Lakin et al 1999, Zou und Elledge 2003). MDM2 und MDMX ubiquitylieren p53, was dessen Abbau bewirkt (Chen et al 2005, Goldberg et al 2002, Brooks et al 2007). PP1 reduziert die Aktivität von p53 konstitutiv durch Dephosphorylierung; das Ausmaß der Phosphorylierung von p53 in der DNA-Schadens-Antwort überwiegt temporär seine Dephosphorylierung (Li et al 2006a). PML stabilisiert p53 (Bao-Lei et al 2006).
29. RPA-P-ATR-ATRIP-P · !MDMX · !MDM2 · !PP1 · PML* → p53-P	1	ATM phosphoryliert BRCA1 an Serin 1387, 1423 und 1524; BARD1 stabilisiert BRCA1 (Fabbro et al 2004, Cortez et al 1999, Gatei et al 2000).
30. 2 ATM-P → BARD1-BRCA1-P	1	Abhängig vom BARD1-BRCA1-Komplex wird p53 von ATM an Serin 15 phosphoryliert (Bakkenist und Kastan 2003, Fabbro et al 2004, Li et al 2006a); siehe logische Funktion 29 bzgl. der Einflüsse von MDM2, MDMX, PML und PP1 auf p53.
31. 2 ATM-P · !MDMX · !MDM2 · BARD1-BRCA1-P · !PP1 · PML* → p53-P	1	Chk1-P phosphoryliert p53 an Serin 20 (Shieh et al 2000, Ou et al 2005); siehe logische Funktion 29 bzgl. der Einflüsse von MDM2, MDMX, PML und PP1 auf p53.
32. Chk1-P · !MDMX · !MDM2 · !PP1 · PML* → p53-P	1	Chk2 vermittelt die Phosphorylierung von p53 an Serin 20 (Shieh et al 2000, Ou et al 2005); siehe logische Funktion 29 bzgl. der Einflüsse von MDM2, MDMX, PML und PP1 auf p53.
33. Chk2-P · !MDMX · !MDM2 · !PP1 · PML* → p53-P	1	MDM2 ubiquityliert HIPK2, was zu dessen Abbau führt; mehr DSBs führen zu verstärktem Abbau von MDM2, so dass HIPK2 zunehmend stabilisiert wird (Rinaldo et al 2007, Dauth et al 2007). Den durch DSBs induzierten Abbau von MDM2 beschreibt die logische Funktion 27; die Erhöhung der Rate des Abbaus infolge eines erhöhten Ausmaßes an DNA-Schäden wird vom Modell nicht wiedergegeben.
34. !MDM2 → HIPK2	1	HIPK2 phosphoryliert p53 an Serin 46, nachdem p53 bereits an anderen Aminosäureresten phosphoryliert wurde und bereits die Transkription einiger Zielgene aktiviert (Rinaldo et al 2007, Dauth
35. p53-P · HIPK2 → p53-P-PS46	1	

Anhang

		et al 2007).
36. 2 ATM-P · TopBP1* · IPP2A-Bx · PP5* → RPA-P-ATR-ATRIP-P	1	ATM rekrutiert RPA-P-ATR-ATRIP zu DSBs (Robison et al 2007, Zou und Elledge 2003, Adams et al 2006), diese Abhängigkeit von ATM wurde zudem in Fibroblastenzellen gezeigt (Jazayeri et al 2006, Reinhardt et al 2007); siehe logische Funktion 14 bzgl. der Einflüsse von TopBP1, PP2A-Bx, und PP5 auf RPA-P-ATR-ATRIP.
37. Chk2-P → E2F-1-P	1	Chk2-P stabilisiert E2F-1 durch Phosphorylierung an Serine 364 (Stevens et al 2003).
38. !Chk1-P · !Chk2-P → Cdc25A	1	Chk1-P und Chk2-P phosphorylieren Cdc25A an Serin 76 bzw. 123, was jeweils zur Ubiquitinylierung und Abbau von Cdc25A führt (Falck et al 2001, Jin et al 2008).
39. Cdc25A → Cdk2	1	Cdc25A aktiviert Cdk2 durch Dephosphorylierung an Tyrosin-Resten (Blomberg und Hoffmann 1999, Falck et al 2001).
40. Chk2-P → Cdc25C-P	1	Chk2-P phosphoryliert Cdc25C an Serin 216 (Matsuoka et al 1998, Pedram et al 2009).
41. DNA DSBs early · !DNA DSBs late → Cdt2-DDB1	1	In der frühen Phase nach Auftreten von DSBs ist der Komplex aus Cdt2 und DDB1 temporär aktiv. Später (zum Zeitskalenwert 2) wird der Komplex inaktiv (Stuart und Wang 2009).
42. DNA DSBs early · Hsp90* → PIDD	1	DSBs bewirken die Aktivierung von PIDD durch autokatalytische Spaltung; das ist von Hsp90 (α or β ?) abhängig, jedoch innerhalb der ersten Stunden der DNA-Schadens-Antwort in humanen Epithelzellen von p53 unabhängig (Cuenin et al 2008, Tinel et al 2007, Tinel et al 2010).
43. PIDD → PIDD-RAIDD-caspase2	2	PIDD bindet über RAIDD an Caspase-2, welche dann aktiviert wird. Dies erfolgt später als die Bindung von PIDD an RIP1 und NEMO (logische Funktion 44) (Cuenin et al 2008, Janssens et al 2005, Tinel und Tschopp 2004).
44. PIDD · NEMO* → PIDD-RIP1-NEMO-PIASy	1	PIDD und freies (d. h. nicht im IKK-Komplex gebundenes, S. Miyamoto, persönl. Mitteilung) NEMO transloziert in den Nukleus und bildet dort mit RIP1 und PIASy einen Komplex (Tinel et al 2007, Janssens et al 2005, Mabb et al 2006, Wu et al 2006); auch in embryonalen Fibroblastenzellen von Mäusen wurde eine Beteiligung von RIP1 an diesem zur Aktivierung von NF-κB führenden DSBs-induzierten Signaltransduktionsweg gezeigt (Hur et al 2003).
45. PIDD-RIP1-NEMO-PIASy · !SENP2 → PIDD-RIP1-NEMO-S	1	In den Komplex PIDD-RIP1-NEMO eingebundenes NEMO wird durch PIASy sumoyliert (Bindung von SUMO-1) (Janssens et al 2005, Mabb et al 2006, Yang et al 2011a); SENP2 desumoyliert NEMO (Lee et al 2011).
46. 2 ATM-P · PIDD-RIP1-NEMO-S → ATM-P-RIP1-NEMO-P	1	ATM phosphoryliert sumoyliertes NEMO an Serin 85 (Huang et al 2003, Wu et al 2006). RIP1 ist mindestens bis zur Phosphorylierung von TAK1 in diesem Signalweg (logische Funktion 51) an ATM gebunden (Yang et al 2011a).
47. ATM-P-RIP1-NEMO-P · cIAP1 → nuclear ATM-P-RIP1-NEMO-Ub	1	Phosphoryliertes NEMO wird jeweils an Lysin 277 und 309 von cIAP1 monoubiquitinyliert (Huang et al 2003, Wu et al 2006, Jin et al 2009).
48. nuclear ATM-P-RIP1-NEMO-Ub · Ca ^{2+*} → cytosolic ATM-P-RIP1-NEMO-Ub	1	Der Export von ATM-P-RIP1-NEMO-Ub ins Zytosol ist abhängig von Ca ²⁺ , dennoch erfolgt innerhalb von 6 h nach Auftreten von DSBs kein signifikanter Anstieg der intrazellulären Konzentration von Ca ²⁺ (Wu et al 2006, Berchtold et al 2007, Gangadharan et al 2010). RIP1 ist mindestens bis zur Phosphorylierung von TAK1 in diesem Signalweg (logische Funktion 51) an ATM gebunden (Yang et al 2011a).
49. cytosolic ATM-P-RIP1-NEMO-Ub · Ubc13* · XIAP → ATM-P-RIP1-NEMO-Ub-TRAF6-Ub-ELKS-Ub	1	Abhängig von ATM und Ubc13 wird TRAF6 ubiquitinyliert (Hinz et al 2010); ELKS wird abhängig von ATM, Ubc13 und XIAP ubiquitinyliert (über Lysin 63 verknüpfte Ubiquitinreste) (Wu et al 2010). RIP1 ist mindestens bis zur Phosphorylierung von TAK1 in diesem Signalweg (logische Funktion 51) an ATM gebunden (Yang et al 2011a). Alle Proteine, die in diesem Modell im Abschnitt dieses Signalwegs zwischen dem Eintritt von ATM ins Zytosol und der Phosphorylierung des IKK-Komplexes wirken, bilden einen Komplex (Mabb et al 2006, Wu et al 2006, Jin et al 2009, Stilmann et al 2009, Wu et al 2010, Hinz et al 2010).
50. ATM-P-RIP1-NEMO-Ub-TRAF6-Ub-ELKS-Ub · LUBAC* → ATM-P-RIP1-NEMO-Ub-TRAF6-Ub-ELKS-Ub-TAB	1	Abhängig von ATM, XIAP und ELKS-Ub wird NEMO an Lysin 285 und/oder Lysin 309 ubiquitinyliert (Bindung einer linearen Polyubiquitinylnette), dies erfolgt im Zytosol durch den LUBAC (SHARP-HOIP-HOIL-1)-Komplex (Niu et al 2011). RIP1 ist mindestens bis zur Phosphorylierung von TAK1 in diesem Signalweg (logische Funktion 51) an ATM gebunden (Yang et al 2011a). Alle Proteine, die in diesem Modell im Abschnitt dieses Signalwegs zwischen dem Eintritt von ATM ins Zytosol und der Phosphorylierung des IKK-Komplexes wirken, bilden einen Komplex (Mabb et al 2006, Wu et al 2006, Jin et al 2009, Stilmann et al 2009, Wu et al 2010, Hinz et al 2010).
51. ATM-P-RIP1-NEMO-Ub-TRAF6-Ub-ELKS-Ub-TAB → TAK1-P	1	Abhängig von ATM, ELKS-Ub, Ubc13, TRAF6, TAB (TAB1 oder TAB2 ?), XIAP und linear ubiquitinyliertem NEMO wird TAK1 phosphoryliert (Wu et al 2010, Hinz et al 2010, Jin et al 2009, Niu et al 2011). RIP1 ist mindestens bis zur Phosphorylierung von TAK1 in diesem Signalweg (logische Funktion 51) an ATM

Anhang

		gebunden (Yang et al 2011a). Alle Proteine, die in diesem Modell im Abschnitt dieses Signalwegs zwischen dem Eintritt von ATM ins Zytosol und der Phosphorylierung des IKK-Komplexes wirken, bilden einen Komplex (Mabb et al 2006, Wu et al 2006, Jin et al 2009, Stilmann et al 2009, Wu et al 2010, Hinz et al 2010).
52. RPA-P-ATR-ATRIP-P · TAK1-P → p38-P	1	Abhängig von den Kinaseaktivitäten von ATR und TAK1 wird p38α an Threonin 180 und Tyrosin 182 phosphoryliert (Yang et al 2011a, Cannell et al 2010). Aus der logischen Funktion 36 folgt, dass die durch DSBs induzierte Aktivität von ATR von ATM abhängt (siehe auch Lafarga et al 2009); phosphoryliertes p38α wird vom Nukleus ins Zytosol exportiert (Ben-Levy et al 1998).
53. p38-P → MK2-P	1	Abhängig von p38α wird MK2 an Threonin 334 phosphoryliert; dies erfolgt auch in Zellen mit funktionellem p53, wie in der Zelllinie HEK293 (funktionelles p53) gezeigt wurde (Yang et al 2011a, Cannell et al 2010).
54. p38-P · MK2-P → HuR	1	Abhängig von DSBs-induzierten Phosphorylierungen von p38α und MK2 steigt die Proteinkonzentration von HuR an (Lafarga et al 2009).
55. MK2-P → miR-34c	1	Phosphoryliertes MK2 vermittelt die Expression der microRNA miR-34c; dies erfolgt auch in Zellen mit funktionellem p53, wie in der Zelllinie HEK293 gezeigt wurde (Cannell et al 2010).
56. miR-34c → c-Myc	1	miR-34c hemmt die Expression von c-Myc; dies erfolgt auch in Zellen mit funktionellem p53, wie in der Zelllinie HEK293 gezeigt wurde (Cannell et al 2010).
57. !TAK1-P · !p90-P → PP1-CUEDC2	1	Der Komplex PP1-CUEDC2 dephosphoryliert den IKK-Komplex konstitutiv; Kinasen, die den IKK-Komplex in der DNA-Schadens-Antwort phosphorylieren (logische Funktionen 62 und 63), verdrängen PP1-CUEDC2 temporär vom IKK-Komplex (Li et al 2008).
58. cytosolic ATM-P-RIP1-NEMO-Ub → MEK-P	1	Abhängig von zytosolischem ATM-P-RIP1-NEMO-Ub wird MEK1/2 phosphoryliert. Daneben kommt es in einer früheren Phase zumindest nach Induktion mit ionisierender Strahlung unabhängig von ATM zur Phosphorylierung von MEK1/2, was jedoch nicht zur Aktivierung von NF-κB führt, und nicht ins Modell aufgenommen wurde (Tang et al 2002, Panta et al 2004, Li et al 2006b, Ahmed et al 2009).
59. MEK-P → ERK-P	1	MEK1/2 phosphoryliert ERK1/2 (Panta et al 2004, Ahmed et al 2009).
60. ERK-P → p90-P	1	ERK1/2 bewirkt die Phosphorylierung von p90 ^{RSK1} (Panta et al 2004, Sturgill et al 1988).
61. In <i>CNA</i> : IKK complex* → IKK complex-P In <i>GINSim</i> : !TAK1-P + !p90-P → IKK-P	1	Die basale (konstitutive) Phosphorylierung des IKK-Komplexes (Aktivitätszustand 1) bewirkt die konstitutive Aktivität von c-Rel; dieser Transkriptionsfaktor bewirkt wiederum die konstitutive Expression von Claspin (Kenneth et al 2010, siehe auch logische Funktionen 67 und 70).
62. p90-P · !PP1-CUEDC2 · IKK complex* → 2 IKK complex-P	1	Abhängig von p90 ^{RSK1} wird die Untereinheit IKKβ des IKK-Komplexes über das basale Ausmaß (Aktivitätszustand 1) hinaus phosphoryliert (Aktivitätszustand 2) (Panta et al 2004, Bottero et al 2001); p90 ^{RSK1} verdrängt wie andere Kinasen PP1-CUEDC2 temporär vom IKK-Komplex (Li et al 2008).
63. TAK1-P · !PP1-CUEDC2 · IKK complex* → 2 IKK complex-P	1	Abhängig von TAK1 wird die Untereinheit IKKβ des IKK-Komplexes über das basale Ausmaß (Aktivitätszustand 1) hinaus phosphoryliert (Aktivitätszustand 2) (Berchtold et al 2007, Li et al 1998, Jin et al 2009, Perkins 2007, Wu et al 2010, Hinz et al 2010, Bottero et al 2001); TAK1 verdrängt wie andere Kinasen PP1-CUEDC2 temporär vom IKK-Komplex (Li et al 2008).
64. In <i>CNA</i> : !IKK complex-P → 2 IκBα Aktivitätszustände von IκBα in <i>GINSim</i> : ,2' (basaler Aktivitätszustand) ,1' wenn IKK_complex-P=1 ,1' IKK_complex-P=2 ,2' FKBP51=1 ,1' IKK_complex-P=1 · FKBP51=1 ,0' IKK_complex-P=2 · FKBP51=1 ,2' nuclear_p50-p65-P=1 ,1' nuclear_p50-p65-P=1 · IKK_complex-P=1 ,1' nuclear_p50-p65-P=1 · IKK_complex-P=2 ,2' nuclear_p50-p65-P=1 · FKBP51=1 ,1' nuclear_p50-p65-P=1 · FKBP51=1 · IKK_complex-P=1 ,1' nuclear_p50-p65-P=1 · FKBP51=1 · IKK_complex-P=2	1	Nur bei Abwesenheit von stimulierter und basaler Phosphorylierung des IKK-Komplexes ist IκBα stabil (Aktivitätszustand 2) (Li et al 1998, Strozyk et al 2006, Bottero et al 2001, DiDonato et al 1996). In <i>GINSim</i> sind die Aktivitätszustände von IκBα aufgrund der Funktionsweise des Algorithmus nicht über logische Funktionen, sondern über die Bedingungen definiert, unter denen IκBα die Aktivitätszustände ,0', ,1' und ,2' einnimmt.
65. In <i>CNA</i> : !FKBP51* → IκBα Aktivitätszustände von IκBα in <i>GINSim</i> : siehe Angaben zur Interaktion 64	1	Der vom IKK-Komplex vermittelte Abbau von IκBα ist von FKBP51 abhängig (Romano et al 2004). In <i>GINSim</i> sind die Aktivitätszustände von IκBα nicht über logische Funktionen, sondern über die Bedingungen definiert, unter denen IκBα die Aktivitätszustände ,0', ,1' und ,2' einnimmt.
66. In <i>CNA</i> : 2 IKK complex-P → IκBα Aktivitätszustände von IκBα in <i>GINSim</i> : siehe Angaben zur Interaktion 64	1	Die Phosphorylierung von IκBα durch den IKK-Komplex führt zum Abbau von IκBα (Li et al 1998, Strozyk et al 2006, Bottero et al 2001, DiDonato et al 1996).

Anhang

		In <i>GINsim</i> sind die Aktivitätszustände von IκBα nicht über logische Funktionen, sondern über die Bedingungen definiert, unter denen IκBα die Aktivitätszustände ‚0‘, ‚1‘ und ‚2‘ einnimmt.
67. IκBα → cytosolic c-Rel	1	Der konstitutive basale Abbau von IκBα (infolge basaler Aktivität des IKK-Komplexes) führt zur Freisetzung und basalen Aktivität von c-Rel, das wiederum eine basale Expression von Claspin bewirkt (Hayden und Gosh 2008, Xu et al 2008, Kenneth et al 2010, RadiationGenes Database).
68. IκBα → cytosolic p50-p50	1	Der Abbau (Aktivitätszustand 0) von IκBα führt zur Freisetzung des NF-κB-Dimers p50-p50 (Hayden und Gosh 2008).
69. IκBα → cytosolic p50-p65	1	Der Abbau (Aktivitätszustand 0) von IκBα führt zur Freisetzung des NF-κB-Dimers p50-p65 (Hayden und Gosh 2008).
70. cytosolic c-Rel · importin α-1-β-1* → nuclear c-Rel	1	Freigesetztes c-Rel wird nach Bindung an Importin α-1 und Importin β-1 in den Nukleus transportiert (Hayden und Gosh 2008, Xu et al 2008).
71. cytosolic p50-p50 · importin α-1-β-1* → nuclear p50-p50	1	Das freigesetzte NF-κB-Dimer p50-p50 wird nach Bindung an Importin α-1 und Importin β-1 in den Nukleus transportiert (Hayden und Gosh 2008, Xu et al 2008).
72. DNA DSBs early · IKKε* → IKKε-P	1	DSBs stimulieren die Ansammlung von IKKε im Nukleus, wo IKKε phosphoryliert wird (Renner et al 2010).
73. IKKε-P · PML* → PML-PS38	1	Phosphoryliertes IKKε bewirkt die Phosphorylierung von PML an Serin 38 (Renner et al 2010).
74. IKKε-P · PML-PS38 · TOPORS* → IKKε-S-P	1	Phosphoryliertes IKKε wird von TOPORS an Lysin 231 sumoyliert (Bindung von SUMO-1); dies ist abhängig von an Serin 38 phosphoryliertem PML (Renner et al 2010).
75. cytosolic p50-p65 · importin α-1-β-1* · IKKε-S-P → nuclear p50-p65-P	1	Das freigesetzte NF-κB-Dimer p50-p65 wird nach Bindung an Importin α-1 und Importin β-1 in den Nukleus transportiert (Hayden und Gosh 2008, Xu et al 2008). IKKε-S-P vermittelt die Phosphorylierung von p65 an Serin 468; zusätzlich wird p65 an Serin S536 phosphoryliert (Renner et al 2010, Tapia et al 2007); beide Phosphorylierungen aktivieren allgemein die Transaktivierung durch p65 (Perkins 2006).
76. Chk2-P · PML* → PML-PS117	1	Chk2-P phosphoryliert PML an Serin 117 (Yang et al 2002).
77. DNA DSBs late → PP2A-Bx	3	In der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort (Zeitskalenwert 3) wird PP2A-Bx erneut aktiv (Feng et al 2009, Leung-Pineda et al 2006). Da PP2ABx im Modell nicht durch spezifische Proteine reguliert wird, spielt es keine Rolle, ob ATR und Chk2 durch PP2A mit derselben B-Untereinheit („Bx“) reguliert werden.
78. I <p>53-P-PS46 → Bcl-3</p>	1	An Serin 15 phosphoryliertes p53 vermittelt eine Destabilisierung von Bcl-3 (Rocha et al 2003); da dieses Ereignis wahrscheinlich eine pro-apoptische Wirkung hat, könnte eine zusätzliche Phosphorylierung von p53 an Serin 46 hierfür essentiell sein (die pro-apoptische Form von p53 im Modell ist an Serin 46 phosphoryliert, siehe logische Funktion 95); da jedoch Belege einer anti-apoptischen Wirkung von Bcl-3 nach Erzeugung von SSBs oder SSBs fehlen, wurde Bcl-3 nicht mit dem Output „ONSET-OF-APOPTOSIS“ verbunden.
79. I Bcl-3 → HDAC1	1	In Abwesenheit von Bcl-3 bindet HDAC1 an das Chromatin-gebundene NF-κB-Dimer p52-p52 (Rocha et al 2003).
80. Bcl-3 · IHDAC1 → Bcl-3-p52-p52	1	Bcl-3 und HDAC1 binden kompetitiv an p52-p52; an Bcl-3 gebundenes p52-p52 aktiviert die Transkription von Zielgenen (Rocha et al 2003).
81. p53-P · HuR · ICdt2-DDB1 → p21	2	In der frühen Phase der durch DSBs induzierten Signaltransduktion fördert Cdt2-DDB1 die Polyubiquitylierung von p21, was zu dessen Abbau führt; dies erfolgt unabhängig von ATM (Stuart et al 2009); später (zum Zeitskalenwert 2) vermittelt p53-P die Expression von p21 (El-Deiry et al 1993, Han et al 2002, Vousden und Prives 2009), HuR stabilisiert die p21 mRNA durch Bindung (Lafarga et al 2009).
82. p53-P → Wip1	3	An Serin 15 oder Serin 20 phosphoryliertes p53 aktiviert die Expression von Wip1 in der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort (zum Zeitskalenwert 3) (Fiscella et al 1997).
83. p53-P-PS46 → HTRA2	3	Pro-apoptisches p53 (p53-P-PS46) vermittelt den Anstieg der Proteinkonzentration von HTRA2 in der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort (zum Zeitskalenwert 3) (Bartling et al 2004, Jin et al 2003).
84. IHTRA2 → XIAP	1	HTRA2 bindet und inaktiviert XIAP (Srinivasula et al 2003, Martins et al 2002).
85. p53-P-PS46 → Diablo	3	Pro-apoptisches p53 (p53-P-PS46) vermittelt den Anstieg der Proteinkonzentration von Smac/Diablo im Zytosol in der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort (zum Zeitskalenwert 3) (Yu et al 2007, Schuler und Green 2001, Bartling et al 2004).
86. I Diablo → cIAP1	1	Diablo inhibiert cIAP1 (Du et al 2000, Dai et al 2008, Fandy et al 2008, Yang et al 2011b).
87. p53-P → MDM2	3	p53-P vermittelt die Expression von MDM2 in der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort (zum Zeitskalenwert 3) (Ard et al 2002, Phillips et al 2010, Lev-Bar et al 2000).
88. In CNA: nuclear p50-p65-P → IκBα Aktivitätszustände von IκBα in <i>GINsim</i> : siehe Angaben zur	3	Phosphoryliertes p50-p65 vermittelt die Expression von IκBα in Reaktion auf zahlreiche Stimuli, inklusive DNA-Strangbrüchen

Anhang

Interaktion 64		(zum Zeitskalenwert 3) (Mabb et al 2006, Ma et al 2009, Hayden und Gosh 2008). In <i>GINsim</i> sind die Aktivitätszustände von IκBα nicht über logische Funktionen, sondern über die Bedingungen definiert, unter denen IκBα die Aktivitätszustände ‚0‘, ‚1‘ und ‚2‘ einnimmt.
89. nuclear p50-p65-P → SENP2	3	Phosphoryliertes p50-p65 vermittelt die Expression von SENP2 in der späten Phase der DNA-Schadens-Antwort (Zeitskalenwert 3) (Lee et al 2011).
90. Iκ-Myc → CELL-CYCLE-ARREST	2	Die gehemmte Expression von c-Myc bewirkt den Zellzyklus-Arrest in der S-Phase (Cannell et al 2010).
91. p21 → CELL-CYCLE-ARREST	2	p21 bewirkt den Zellzyklus-Arrest zwischen der G1- und der S-Phase (Han et al 2002, Lafarga et al 2009).
92. ICDk2 → CELL-CYCLE-ARREST	2	Der Verlust von unphosphoryliertem Cdk2 bewirkt den Zellzyklus-Arrest in der S-Phase (Blomberg und Hoffmann 1999, Falck et al 2001).
93. p53-P → CELL-CYCLE-ARREST	2	Sowohl die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 als auch die an Serin 20 führt zum Zellzyklus-Arrest (Vousden und Prives 2009, Jiang et al 2010).
94. Cdc25C-P → CELL-CYCLE-ARREST	2	Die Phosphorylierung von Cdc25C an Serin 216 bewirkt Zellzyklus-Arrest zwischen der G2- und der M-Phase des Zellzyklus (Peng et al 1997, Boutros et al 2006).
95. p53-P-PS46 · !nuclear_p50-p65-P → ONSET-OF-APOPTOSIS	2	Die Phosphorylierung von p53 an Serin 46 verursacht die Aktivierung der Expression pro-apoptotischer Zielgene von p53 (Vousden und Prives 2009, Jiang et al 2010). In den meisten Fällen wirkt durch DNA-Strangbrüche aktiviertes NF-κB der Apoptose entgegen, indem die Expression anti-apoptotischer Zielgene aktiviert wird (Carson et al 2004, Wu und Miyamoto 2007, McCool und Miyamoto 2012).
96. E2F-1-P · !nuclear_p50-p65-P → ONSET-OF-APOPTOSIS	2	Der phosphorylierte Transkriptionsfaktor E2F-1 aktiviert von p53 unabhängige (und von p53 abhängige) pro-apoptotische Signalwege (Stevens et al 2003, Dong et al 2003). In den meisten Fällen wirkt durch DNA-Strangbrüche aktiviertes NF-κB der Apoptose entgegen, indem die Expression anti-apoptotischer Zielgene aktiviert wird (Carson et al 2004, Wu und Miyamoto 2007, McCool und Miyamoto 2012).
97. PIDD-RAIDD-caspase2 · !nuclear_p50-p65-P → ONSET-OF-APOPTOSIS	2	Caspase-2 vermittelt nach seiner Aktivierung im Komplex PIDD-RAIDD-caspase2 den Eintritt in die Apoptose (Tinel und Tschopp 2004, Tinel et al 2007, Cuenin et al 2008). In den meisten Fällen wirkt durch DNA-Strangbrüche aktiviertes NF-κB der Apoptose entgegen, indem die Expression anti-apoptotischer Zielgene aktiviert wird (Carson et al 2004, Wu und Miyamoto 2007, McCool und Miyamoto 2012).
98. PML-PS117 · !nuclear_p50-p65-P → ONSET-OF-APOPTOSIS	2	An Serin 117 phosphoryliertes PML bewirkt unabhängig von p53 Apoptose (Yang et al 2002). In den meisten Fällen wirkt durch DNA-Strangbrüche aktiviertes NF-κB der Apoptose entgegen, indem die Expression anti-apoptotischer Zielgene aktiviert wird (Carson et al 2004, Wu und Miyamoto 2007, McCool und Miyamoto 2012).

* im Modell konstitutiv aktive („1“) regulatorische Komponenten

Anhang 3: Logische stationäre Zustände der detaillierten Modellvarianten

Regulatorische Komponente	Logischer stationärer Zustand der Variante A, B, C, D bzw. E des detaillierten Netzwerks				
	A	B	C	D	E
APOPTOSIS_ONSET_OF				0	1
ATM-P				2	0
ATM-P-RIP1-NEMO-P				0	1
ATM-P-RIP1-NEMO-Ub-TRAF6-Ub-ELKS-Ub				0	0
ATM-P-RIP1-NEMO-Ub-TRAF6-Ub-ELKS-Ub-TAB				0	0
BARD1-BRCA1-P				1	0
Bcl-3				1	1
Bcl-3-p52-p52				1	1
bleomycin				0	0
Ca ²⁺				1	1
c-Abl-P				1	0
camptothecin				0	0
Cdc25A				0	1
Cdc25C-P				1	0
Cdc7				1	1
Cdt2-DDB1				0	0
Cdk2				0	1
CELL_CYCLE_ARREST				1	1
Chk1-P				0	0
Chk2-P				1	0
clAP1				1	1
claspin-P				1	1
c-Myc				1	1
cytosolic ATM-P-RIP1-NEMO-Ub				0	0
cytosolic c-Rel				1	1
cytosolic p50-p50				0	0
cytosolic p50-p65				0	0
daunomycin				0	0
Diablo				0	0
DNA_DSBs_early				1	1
DNA_DSBs_late				1	1
DNA_SSBs				0	0
doxorubicin				0	0
E2F-1-P				1	0
ERK-P				0	0
FHIT				1	1
FKBP51				1	1
HDAC1				0	0
HIPK2				1	0
Hsp90				1	1
HTRA2				0	0
HU				0	0
HuR				0	0
IkBα				1	1
IKK_complex-P				1	1
IKKε				1	1
IKKε-P				1	1
IKKε-S-P				1	1
importin_α-1_β-1				1	1
IR				1	1
Ku				1	1
LUBAC				0	0
MDM2				0	1
MDMX				0	0
MEK-P				0	0
miR-34c				0	0
MK2-P				0	0
MRN				1	1
MRN-P				1	0
NEMO				1	1
nuclear ATM-P-RIP1-NEMO-Ub				0	0
nuclear c-Rel				1	1
nuclear p50-p50				1	0
nuclear p50-p65-P				1	0
p21				0	0
p38-P				0	0
p53-P				0	1
p53-P-PS46				0	0
p90-P				0	0
PARP1-PAR				1	1
PIDD				1	1
PIDD-RAIDD-caspase2				1	1
PIDD-RIP1-NEMO-PIASy				1	1
PIDD-RIP1-NEMO-S				0	1
PML				1	1
PML-PS117				1	0
PML-PS38				1	1
PP1				0	1
PP1-CUEDC2				1	1
PP2A-B55				0	1
PP2A-Bx				1	1
PP5				1	1
RPA-P-ATR-ATRIP-P				0	0
SENP2				1	0
SN38				0	0
TAK1-P				0	0
Timeless-Tipin				1	1
TopBP1				1	1
topoisomeraseI				1	1
topoisomeraseII				1	1
TOPORS				1	1
Ubc13				1	1
VP16				0	0
Wip1				0	1
XIAP				1	1

kein logischer stationärer Zustand

kein logischer stationärer Zustand

kein logischer stationärer Zustand

Anhang

Anhang 4: Von der Suche nach potentiellen therapeutischen Zielstrukturen ausgeschlossene Spezies (vgl. Tab. 4.2)

Ausgeschlossenes Zielmolekül, -ion	Begründung
ATRIP	keine enzymatische Aktivität und kein Transkriptionsfaktor (<i>UniProtKB</i>)
Ca ²⁺	Inhibition würde zu viele Funktionen beeinträchtigen, die nicht im Modell berücksichtigt sind (Bootman et al 2009)
c-Abl	Inhibition würde zu viele Funktionen beeinträchtigen, die nicht im Modell berücksichtigt sind (<i>UniProtKB</i>)
Cdc7	essentiell für Proliferation (<i>UniProtKB</i>)
clAP1	Inhibition würde zu viele Funktionen beeinträchtigen, die nicht im Modell berücksichtigt sind (<i>UniProtKB</i>)
claspin-P	keine enzymatische Aktivität und kein Transkriptionsfaktor (<i>UniProtKB</i>)
ELKS	keine enzymatische Aktivität und kein Transkriptionsfaktor (<i>UniProtKB</i>)
FHIT	herkömmliche Inhibitoren von FHIT (Substratanaloge) scheinen auf die Rolle von FHIT in der DNA-Schadens-Antwort eine fördernde Wirkung zu haben (Varnum et al 2001, Saldívar et al 2010), diese eignen sich daher vermutlich nicht zur gezielten Unterbrechung von Signalwegen der DNA-Schadens-Antwort
importin $\alpha_1 \beta_1$	Inhibition würde zu viele Funktionen beeinträchtigen, die nicht im Modell berücksichtigt sind (<i>UniProtKB</i>)
miR-34c	microRNA, daher keine enzymatische Aktivität und kein Transkriptionsfaktor
NEMO	keine enzymatische Aktivität und kein Transkriptionsfaktor (<i>UniProtKB</i>)
p38 α	Inhibition würde zu viele Funktionen beeinträchtigen, die nicht im Modell berücksichtigt sind (<i>UniProtKB</i>)
PIASy	Inhibition würde zu viele Funktionen beeinträchtigen, die nicht im Modell berücksichtigt sind (<i>UniProtKB</i>)
PML	Inhibition würde zu viele Funktionen beeinträchtigen, die nicht im Modell berücksichtigt sind (<i>UniProtKB</i>)
RIP1	Funktion von RIP1 im Modell ist von der Kinase-Aktivität unabhängig (Biton und Ashkenazi 2011)
RPA	essentiell für Proliferation (<i>UniProtKB</i>)
TAB-Proteine	keine enzymatische Aktivität und kein Transkriptionsfaktor (<i>UniProtKB</i>)
Timeless-Tipin	essentiell für Proliferation (<i>UniProtKB</i>)
TopBP1	essentiell für Proliferation (Mäkinen et al 2001)
TOPORS	fördert die Proliferation (<i>UniProtKB</i>)
Ubc13	essentiell für Proliferation (<i>UniProtKB</i>)

Anhang 5: Aktivitäten und Inaktivitäten, die von der Suche nach molekularen Defekten, die potentiell zur Karzinogenese beitragen, ausgeschlossen wurden (vgl. Tab. 4.4)

Ausgeschlossene Aktivität von	Begründung
ATM-P	Tumor-Suppressor (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
BARD1-BRCA1-P	BRCA1 ist ein Tumor-Suppressor (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
Chk2-P	Tumor-Suppressor (Sherr et al 2004)
E2F1-P	Tumor-Suppressor (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
FHIT	Tumor-Suppressor (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
p53-P	Tumor-Suppressor (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
Ausgeschlossene Inaktivität von	Begründung
c-Abl-P	kodierendes Gen ist ein Proto-Onkogen (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
Cdc7	erhöhte Expression geht mit Tumorwachstum einher (<i>UniProtKB</i>)
Chk1-P	essentiell für Proliferation (Petermann et al 2010)
c-Myc	kodierendes Gen ist ein Proto-Onkogen (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
c-Rel	kodierendes Gen ist ein Proto-Onkogen (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
MDM2	kodierendes Gen ist ein Proto-Onkogen (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
PML	kodierendes Gen ist ein Proto-Onkogen (<i>The Tumor Gene Family of Databases</i>)
PP1	essentiell für Proliferation (<i>UniProtKB</i>)
RPA-P-ATR-ATRIP-P	ATR und RPA sind essentiell für Proliferation (Nam und Cortez 2011, <i>UniProtKB</i>)
Timeless-Tipin	essentiell für Proliferation (<i>UniProtKB</i>)
TopBP1	essentiell für Proliferation (<i>UniProtKB</i>)
topoisomerase I	kodierendes Gen ist ein Proto-Onkogen (<i>UniProtKB</i>)

11. Wissenschaftliche Publikationen

Publikationen zur Veröffentlichung von Daten aus dieser Dissertation:

Poltz R, Naumann M. Dynamics of p53 and NF- κ B regulation in response to DNA damage and identification of target proteins suitable for therapeutic intervention. BMC Syst Biol. 2012;6(1):125. Epub 2012 Sep 15.

Poltz R, Franke R, Schweitzer K, Klamt S, Gilles ED, Naumann M. Logical network of genotoxic stress-induced NF- κ B signal transduction predicts putative target structures for therapeutic intervention strategies. Adv Appl Bioinform Chem. 2009;2:125-38. Epub 2009 Dec 3.

Weitere Publikationen:

Poltz R, Naumann M. Microbes and men – a complicated coexistence. Systems Biology – Results, Progress and Innovations from BMBF Funding. Bundesministerium für Bildung und Forschung 2008.

Gembka A, Toueille M, Smirnova E, **Poltz R**, Ferrari E, Villani G, Hübscher U. The checkpoint clamp, Rad9-Rad1-Hus1 complex, preferentially stimulates the activity of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta in long patch base excision repair. Nucleic Acids Res. 2007;35(8):2596-608. Epub 2007 Apr 10.

Erklärung

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Logische Modellierung der DNA-Schadens-Antwort in humanen Epithelzellen“

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 27.08.2012

Rainer Poltz