

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

**ZELLZYKLUS- UND DICHTABHÄNGIGKEIT TODESREZEPTOR-
VERMITTELTEN APOPTOSE UND UNTERSUCHUNGEN DES VON RKO-
ZELLEN KONDITIONIERTEN MEDIUMS**

Fachbereich 14:
CHEMISCHE UND PHARMAZEUTISCHE
WISSENSCHAFTEN

Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von:

dipl. oec. troph.

Ina Oehme

geb. in Karlsruhe

Frankfurt am Main, 2004

(D F 1)

Inhaltsübersicht

1 Einleitung_____	S. 1
2 Material und Methoden_____	S. 34
3 Ergebnisse_____	S. 82
4 Diskussion_____	S. 152
5 Zusammenfassung/Summary_____	S. 186
6 Abkürzungsverzeichnis_____	S. 189
7 Abbildungsverzeichnis_____	S. 192
8 Tabellenverzeichnis_____	S. 195
9 Literaturverzeichnis_____	S. 196
10 Anhang_____	S. 213

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Apoptose	1
1.1.1	Definition und Bedeutung	1
1.1.2	<i>C. elegans</i> – Grundprinzipien der Apoptoseregulation	2
1.1.3	Molekulare Maschinerie der Apoptose in Säugern	3
1.1.3.1	Apoptoseausführende Moleküle: Die Familie der Caspasen	3
1.1.3.2	Intrinsischer Signalweg über die Mitochondrien und die Bildung des Apoptosoms	5
1.1.3.3	Extrinsischer Apoptosesignalweg bzw. rezeptorvermittelte Apoptose	6
1.1.3.4	TRAIL und seine Rezeptoren	8
1.1.4	Regulation der CD95-vermittelten Apoptose	8
1.1.4.1	Hemmung auf der Stufe der Ligandenbindung („Decoy“ Rezeptoren)	9
1.1.4.2	Hemmung auf der Stufe der Caspase-8-Aktivierung im DISC	9
1.1.4.3	Regulierung der Apoptose durch Mitglieder der Bcl-2-Familie	10
1.1.4.4	IAPs hemmen Caspasen durch direkte Interaktion mit Caspase-9, -7, -3	12
1.1.4.5	IAP-regulierende Proteine	13
1.1.4.6	PI3K und Akt verhindern den Zelltod	13
1.1.4.7	Regulierung der Apoptose durch PKC-Isoformen	14
1.1.5	Apoptose und Pathologie	16
1.1.5.1	Apoptosebedingte Krankheiten des Immunsystems	17
1.1.5.2	Apoptose und AIDS	17
1.1.5.3	Apoptose und Tumorerkrankungen	17
1.2	Zellzyklus und Apoptose	19
1.2.1	Zellzyklusregulation	19
1.2.2	Zellzyklus- und Apoptoseregulation humaner Zellen	21
1.2.2.1	Regulierung der CDKs durch spezifische Inhibitoren (CDKI)	22
1.2.2.2	c-Myc	23
1.2.2.3	p53, pRB und E2F	23
1.2.2.4	RAS	23
1.2.2.5	Bcl-2	24
1.2.2.6	NF-κB	24
1.2.2.7	IAPs – Survivin	24
1.2.2.8	Die Rolle der Todesrezeptoren in der Proliferation	25
1.3	Tumormigration, Angiogenese und Metastasierung	26
1.3.1	Zell-Zell-Kontakt durch Integrine und Cadherine	26
1.3.2	Rho-GTPasen beeinflussen Morphologie und Migration der Zellen durch Interaktionen mit dem Zytoskelett	27
1.3.3	Tumorangiogenese	28
1.3.4	Proteolytische Prozessierung von EZM-Molekülen	31
1.4	Ziel der Arbeit	33
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	34
2.1	Chemikalien	34
2.2	Material für die Zellkultur	36

2.2.1 Zelllinien	36
2.2.2 Kulturmedium für RKO-, HeLa- und NIH 3T3-Zellen	36
2.2.3 Kulturmedium für CHO Zellen	37
2.2.4 Selektionsmedium für RKO _{p21} und RKO _{p27}	37
2.2.5 Selektionsmedium für RKO _{p27} -„All-in-one“	37
2.2.6 Selektionsmedium für RKO _{p27} -„neu“	37
2.2.7 Einfriermedium	37
2.2.8 Trypsin-Lösung	37
2.2.9 Zellkulturmaterial	38
2.3 Material für cytometrische und fluorometrische Analysen	38
2.3.1 PBS (pH=7,4)	38
2.3.2 Annexin V Bindungspuffer	38
2.3.3 PI Färbepuffer	38
2.3.4 7-AAD Färbepuffer	38
2.3.5 JC-1 Färbepufferpuffer	38
2.3.6 Apo-BrdU-Kit von BD (TUNEL)	39
2.3.7 Permeabilisierungspuffer für intrazelluläre FACS-Messungen	39
2.3.8 Cytochrom c - Blockpuffer	39
2.3.9 BrdU-Färbung zur Bestimmung der S-Phase	39
2.3.10 Caspase-Aktivitäts-Kit der Firma BioVision, Wertheim	39
2.3.11 Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper	40
2.3.12 Sonstige Materialien	40
2.4 Material für proteinbiochemische Analysen	40
2.4.1 Lysispuffer für Gesamtzelllysate	41
2.4.2 Lysispuffer zur Detektion phosphorylierter Proteine	41
2.4.3 TBS, pH 7,3	41
2.4.4 DISC-Lysispuffer	41
2.4.5 Fraktionierungspuffer A	41
2.4.6 Fraktionierungspuffer B	42
2.4.7 Protein-Färbelösung	42
2.4.8 Zusammensetzung PAGE-Trenngel (12,5%)	42
2.4.9 Zusammensetzung PAGE-Sammelgel	42
2.4.10 Probenpuffer	42
2.4.11 SDS Laufpuffer 10x (5l)	43
2.4.12 Transferpuffer (Semidry-Blotpuffer) 10x (1l)	43
2.4.13 Transferpuffer (Semidry-Blotpuffer) 1x	43
2.4.14 Coomassie Gelfärbelösung (1l)	43
2.4.15 Entfärbelösung für Coomassiegele(1l)	43
2.4.16 Blockmilch für Western Blot Analyse	43
2.4.17 Blockmilch für Western Blot Analyse phosphorylierter Proteine	43
2.4.18 Waschpuffer für Western Blot Analyse phosphorylierter Proteine	44
2.4.19 Antikörper-Verdünnungspuffer für Western Blot Analyse phosphorylierter Proteine	44
2.4.20 Strip-Puffer	44
2.4.21 Sonstige Materialien	44
2.5 Material für die Molekularbiologie	44
2.5.1 TBE-Puffer 10x (1l)	44
2.5.2 DNA-Farbmarker	44
2.5.3 DNA-Probenpuffer (6x)	44
2.5.4 RNA-Probenpuffer (6x)	45
2.5.5 dNTP`s	45
2.5.6 Oligonukleotide	45
2.5.7 Restriktionsverdau	45
2.5.8 Plasmid DNA	45

2.5.9	Transfektionslösung	46
2.5.10	Kompetente Bakterien	46
2.5.11	LB Medium	47
2.5.12	Qiagen Maxi Präp Kit	47
2.5.13	DNA-Extraktionspuffer	47
2.5.14	Sonstige Materialien	47
2.6	Geräte	47
2.7	Kultivierung der Zellen	49
2.7.1	Zelllinien	49
2.7.2	Kryokonservierung der Zellen	49
2.7.3	Auftauen der Zellen	49
2.7.4	Subkultivierung der Zellen	50
2.7.5	Passagieren der Zellen	50
2.7.6	Zellzahlbestimmung	51
2.7.7	PolyHema Beschichtung	51
2.7.8	Zellaussaat für Experimente	51
2.7.9	Apoptoseinduktion	52
2.7.10	Untersuchung des Migrationverhaltens der Zellen	52
2.7.10.1	Migrationstest mit kollagenbeschichteten Transwell-Membranen	52
2.7.10.2	Migrations- und Invasionstest mit CFSE-Färbung	53
2.7.11	Synchronisation proliferierender Zellen	54
2.7.11.1	Serumentzug	54
2.7.11.2	Zugabe von Zellzyklusblockern	55
2.7.12	Transfektion der in Kultur gehaltenen Zellen	55
2.7.13	Retrovirale Transduktion und Virusüberstandkonzentration	56
2.8	Durchflußzytometrische und fluorometrische Analysen	57
2.8.1	Oberflächenfärbung membranständiger Proteine	58
2.8.2	Erfassung frühapoptotischer Zellen mittels Annexin V-Anfärbung	58
2.8.3	Bestimmung der Zellzyklusverteilung und Apoptosequantifizierung mithilfe von PI (Nicoletti)	59
2.8.4	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ mittels JC-1	60
2.8.5	Erfassung der DNA-Fragmentierung mithilfe der TUNEL-Methode	61
2.8.6	Anfärben intrazellulärer Zellbestandteile zur durchflußzytometrischen Vermessung	62
2.8.7	Nachweis aktiver Caspase-3 im FACS	63
2.8.8	Erfassung der Zellzyklusverteilung GFP-exprimierender Zellen mittels Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5	64
2.8.9	Bestimmung des Proliferationsverhaltens über CFSE-Färbung	65
2.8.10	Quantifizierung DNA-replizierender Zellen über BrdU-Einbau	65
2.8.11	Fluorometrische Analyse der Caspaseaktivitäten	66
2.9	Proteinchemische Methoden	67
2.9.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen (Gesamtzellextrakte)	67
2.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	67
2.9.3	Proteinauftrennung mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	67
2.9.4	Immunoblot-Analyse von Proteinen („Western Blot“)	68
2.9.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen	69
2.9.6	Enhanced Chemolumineszenz (ECL) zur Sichtbarmachung von Antigen-Antikörper-Komplexen	70
2.9.7	Wiederverwendung von Western Blot Membranen	71
2.9.8	Isolierung und Analyse des CD95-DISC	71
2.9.9	Fraktionierung in zytosolische und mitochondriale Fraktionen zur Erfassung der Cytochrom c - Freisetzung aus den Mitochondrien	73
2.9.10	Nachweis von Zytokinen im Kulturüberstand (Zytokin-Array)	73

2.10 Molekularbiologische Methoden	75
2.10.1 Bakterien-Transformation durch „Hitzeschock“	75
2.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA	75
2.10.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	76
2.10.4 Restriktionsverdau von DNA	76
2.10.5 Agarose-Gelelektrophorese	77
2.10.6 Klenow – „Fill in“-Reaktion zur Herstellung von DNA-„Blunt ends“	77
2.10.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen (QIAEX II) und DNA-Fällung	78
2.10.8 Ligation von DNA-Fragmenten	78
2.10.9 Sequenzanalyse	79
2.10.10 Präparation und Sichtbarmachung genomischer DNA aus apoptotischen Zellen („DNA-Leiter“)	79
2.10.11 Präparation von Gesamt-RNA	80
2.10.12 DNA-Microarray	81

3 ERGEBNISSE

82

3.1 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen in Zellen mit Ecdyson-induzierbarem Genexpressionsystem für die Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27	82
3.1.1 Das Ecdyson-induzierbare System	82
3.1.2 Apoptoseverhalten der CDK-Inhibitor-überexprimierenden Zellen	84
3.1.3 Expression der Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche der RKO-Zellen	88
3.1.4 Rekrutierung von FADD und Caspase-8 in den CD95-DISC der RKO-Zellen	89
3.1.5 Quantifizierung der Caspase-8-Aktivität	90
3.1.6 Untersuchung der mitochondrialen Ereignisse nach Apoptoseinduktion	90
3.1.7 Analyse der Caspase-3-Aktivität	93
3.1.8 Hydrolyse genomischer DNA nach hCD95L Behandlung	94
3.1.9 Die Rolle der Proteinkinase C in Zellzyklus- und Apoptoseverhalten der RKO-Zellen	95
3.1.10 Ecdysonhomologe inhibieren CD95L- und TRAIL-induzierte Apoptose in Säugerzellen	98
3.1.11 Muristeron beeinflusst die Genexpression der RKO-Zellen	102
3.2 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen mithilfe eines durch AP21967 induzierbaren Genexpressionsystems für die Expression des CDK-Inhibitors p27	104
3.2.1 „All-in-one“ p27- Vektor Genexpressionsystem (<i>ARIAD</i>)	104
3.2.2 Charakterisierung der RKO10 (<i>ARIADp27</i>)-Zellen	105
3.2.3 „p27-neu“-Genexpressionssystem (<i>ARIAD</i>)	107
3.3 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen nach transienter Transfektion von p27- und p21- cDNA	107
3.3.1 Transiente Transfektion der RKO-Zellen	107
3.3.1 Transiente Transfektion der 293T-Zellen	109
3.4 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen unter Verwendung verschiedener Zellzyklussynchronisationsmethoden	109
3.4.1 Synchronisation verschiedener Zelllinien durch Serumentzug	109
3.4.2 Einfluss der Apoptoseinduktion auf die Zellzyklusverteilung der überlebenden RKO-Zellen	113

3.5	Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen proliferierender RKO-Zellen	115
3.5.1	Simultane Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen durch Caspase-3/7-AAD-Anfärbung	115
3.5.2	Untersuchungen zur Cyclin-Expression in apoptotischen RKO-Zellen	117
3.6	Zelldichte und Mediumverbrauch beeinflussen das Apoptoseverhalten von RKO-Zellen	119
3.6.1	Untersuchung der CD95-vermittelte Apoptose dicht gewachsener und mit konditioniertem Medium behandelte RKO-Zellen	119
3.6.2	Auswirkungen des konditionierten Mediums auf das Proliferationsverhalten der RKO-Zellen	122
3.6.3	Expression des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche der dicht und dünn gewachsenen RKO-Zellen	123
3.6.4	Rekrutierung von FADD und Caspase-8 in den CD95-DISC der dünn und dicht gewachsenen RKO-Zellen nach CD95-Aktivierung	124
3.6.5	Untersuchung der Caspase-8-Aktivität	125
3.6.6	Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials	125
3.6.7	Vergleich der Bcl-x _L -Proteinexpression	126
3.6.8	Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien nach CD95-Aktivierung	127
3.6.9	Untersuchung der Caspase-3-Aktivität	128
3.7	Weitere Analyse des anti-apoptotisch wirkenden konditionierten RKO-Überstands	129
3.7.1	Untersuchung zum biologisch wirksamen Bestandteil des konditionierten Mediums der RKO-Zellen	129
3.7.2	Apoptoseverhalten anderer Zelllinien nach Inkubation in konditioniertem RKO-Medium	137
3.7.3	Untersuchung der Vitalität und Proliferationsfähigkeit abgelöster Zellen	138
3.7.4	Protektion durch konditioniertes RKO-Medium gegenüber anderen Apoptosestimuli	139
3.7.5	Analyse apoptoserelevanter Signalübertragungswege nach Behandlung mit konditioniertem Medium	141
3.8	Einfluss des konditionierten Mediums auf das Migrations- und Invasionsverhalten von RKO-Zellen	143
3.8.1	Migrationsverhalten der RKO-Zellen	143
3.8.1	Invasivitätsverhalten der RKO-Zellen	145
3.9	Unterschiedliche Genexpressionsprofile in arretierten konfluenten und proliferierenden, subkonfluenten RKO-Zellen	148

4 DISKUSSION **152**

4.1	Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose muristeronbehandelter RKO-Zellen	152
4.1.1	Die natürliche Funktion der Ecdysone	152
4.1.2	Das ecdysoninduzierbare Genexpressionssystem	152
4.1.3	Die ecdysonbedingte Hemmung des CD95-Signalweges beginnt auf der Ebene der Caspase-8-Aktivierung	153
4.1.4	PKC und PI3K und ihre Rolle in der ecdysonvermittelten Protektion der hCD95L-	

induzierten Apoptose	154
4.1.5 Das Steroidhormon Muristeron beeinflusst die Genexpression in RKO-Zellen	155
4.2 Weitere Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen in RKO-Zellen	158
4.2.1 Etablierung induzierbarer p27-Zellklone mit dem Genexpressionssystem der Firma ARIAD	158
4.2.2 Transiente p21- bzw. p27-Überexpression beeinflusst nicht die CD95-vermittelte Apoptose	159
4.2.3 Synchronisationsexperimente	160
4.2.4 Proliferierende Zellen sterben möglicherweise aus einer bevorzugten Zellzyklusphase heraus	161
4.3 Untersuchungen zur apoptoseinhibierenden Wirkung konditionierten RKO-Zellmediums	164
4.3.1 Die Behandlung mit konditioniertem Medium verlangsamt die Proliferation der RKO-Zellen	164
4.3.2 Die protektive Wirkung des konditionierten Mediums setzt bereits bei der Caspase-8-Aktivierung ein	166
4.3.3 RKO-Zellen produzieren einen anti-apoptotisch wirkenden Überstand	167
4.3.4 RKO-Zellen sekretieren Zytokine in den Kultur-Überstand	167
4.3.5 Untersuchung des sekretierten Faktors	170
4.3.6 Azidose kann als Ursache der Apoptoseprotektion ausgeschlossen werden	171
4.3.7 Die Behandlung mit konditioniertem Medium führt zu morphologischen Veränderungen der RKO-Zellen	171
4.3.8 Die protektive Wirkung des Zellkulturüberstandes ist tumorzellspezifisch	173
4.3.9 Konditioniertes Medium protektioniert gegen TRAIL-, UV- und Staurosporin-induzierte Apoptose	174
4.3.10 Rolle der PI3K und PKC in Apoptoseprotektion und Migration der RKO-Zellen	176
4.3.11 Unterschiedliche Genexpressionsprofile konfluenter und nicht-konfluenter RKO-Zellen	178
4.3.12 Schlussfolgerung	184
5 <u>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY</u>	186
5.1 Zusammenfassung	186
5.2 Summary	187
6 <u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	189
7 <u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	192
8 <u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	195
9 <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	196
10 <u>ANHANG</u>	213

1 Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Definition und Bedeutung

Apoptose ist die Bezeichnung für ein genetisches Programm, welches unter bestimmten Bedingungen in einer Zelle aktiviert wird. Dieses Programm läuft im gesunden Organismus nach vorgegebenen Regeln ab und endet mit dem Tod der Zelle. Der Begriff Apoptose ist aus dem Griechischen entlehnt; hier beschreibt $\alpha\pi\omicron\pi\tau\omicron\sigma\iota\sigma$ das Fallen welcher Blätter von Bäumen im Herbst. Erstmals aufgetaucht in der zellbiologischen Terminologie ist „Apoptose“ im Jahr 1972 (Kerr et al. 1972). Hier beschrieben Kerr et al. die Morphologie einer sterbenden Zelle, die sich deutlich von der einer nekrotischen Zelle unterscheidet. Apoptose stellt eine Sonderform des programmierten Zelltodes dar. Weitere Sonderformen sind Autophagie und nicht-lysosomaler Zelltod, die sich in ihrer Lokalisierung bzw. Beteiligung von Lysosomen unterscheiden. Autophagische Zellen sind in der Lage, sich selbst abzubauen, während Zellen, die einen nicht-lysosomalen Zelltod sterben, folglich ohne jegliche lysosomale Aktivität auskommen (Baehrecke 2002). Apoptotische Zellen dagegen werden durch Nachbarzellen phagozytiert (Heterophagie, Baehrecke 2002).

Seitdem hat das Forschungsinteresse an Apoptose stetig zugenommen, was sich in der „PubMed“-Datenbank ablesen lässt. Dort sind zurzeit über 81.000 Veröffentlichungen zu diesem Thema aufgelistet. Die Relevanz von Apoptose zeigt sich u.a. darin, dass sich ein Organismus ohne den physiologischen Zelltod bestimmter Zellen nicht entwickeln kann. So ist die Apoptose während der Embryonalentwicklung ein wichtiger Faktor für die Ausbildung adulter Gewebe und Organe. Bevor sich z.B. die eigentlichen Nieren eines Lebewesens entwickeln, wird durch Apoptose die zuvor gebildete sog. „Urnieren“ entfernt (Saxen & Sariola 1987). Ähnliches gilt für die Ausbildung von Händen und Füßen, die eine Rückbildung der „Schwimnhäute“ zwischen Fingern und Zehen durch den programmierten Zelltod verlangt (Baehrecke 2002). Desgleichen wird im erwachsenen Organismus das Gleichgewicht zwischen Neubildung und Verlust von Zellen durch Apoptose reguliert (z.B. Leber und Darm, Wyllie 1992). Bei der T-Lymphozytenreifung im Thymus werden z.B. unproduktive und autoreaktive durch Apoptose entfernt, bevor sie in den Blutkreislauf gelangen könnten (Berzins et al. 1999). Geht die Kontrolle über diese Prozesse verloren und sterben zu viele Zellen durch Apoptose,

kann dies zur Degeneration eines Gewebes führen. Im Gegensatz dazu kann mangelnde Apoptose z.B. zur Entstehung und Progression von Tumoren beitragen (Thompson 1995).

Eine apoptotische Zelle weist eine Reihe morphologischer Veränderungen auf. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert und es kommt zu Abschnürungen der Zellmembran („membrane blebbing“) in Gestalt apoptotischer Körperchen („apoptotic bodies“). Diese in Membranen verpackten Zellfragmente verursachen keine entzündliche Reaktion, denn sie werden von umgebenden Makrophagen oder nicht professionell phagozytierenden Nachbarzellen phagozytiert (Savill 1997). Dies wird über sogenannte „eat-me“-Signale an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen ausgelöst. Ein Beispiel eines solchen Signals ist die aktive Translokation der normalerweise an der Innenseite der Membran lokalisierten Phosphatidylserine an die Außenseite der Zelle (Savill & Fadok 2000). Hier liegt auch ein entscheidender Unterschied zur Nekrose, einer anderen Form des Zelltodes. Bei letzterer handelt es sich um einen passiven Prozess (ausgelöst z.B. durch Trauma), bei dem die Zelle anschwillt und die Plasmamembran aufbricht, was zum Freisetzen zytoplasmatischer Bestandteile führt. Dies hat eine Aktivierung des Immunsystems zur Folge und resultiert in einer lokalen Entzündungsreaktion (Wyllie et al. 1980).

1.1.2 *C. elegans* – Grundprinzipien der Apoptoseregulation

Apoptose ist ein evolutionär konservierter Signalweg, der eine Sonderform des programmierten Zelltodes darstellt und in *C. elegans* ausführlich untersucht wurde. Während der Entwicklung des Nematoden werden 1090 somatische Zellen gebildet, von denen wiederum genau 131 Zellen durch Apoptose absterben. Der adulte Organismus besteht dann aus 959 Zellen (Sulston & Horvitz 1977). Die Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Regulation ergab folgendes Modell (Abb. 1.1): Die apoptotische „Kernmaschinerie“ wird von mindestens vier Proteinen gebildet bzw. reguliert, nämlich CED³, CED4, CED9 und Egl-1. Dabei bilden CED4 und CED3 einen apoptoseauslösenden Komplex, der durch Bindung des inhibitorischen CED9-Moleküls gehemmt werden kann. Dieser Komplex aus CED9, CED3 und CED4 befindet sich an der Mitochondrienmembran und hält die Protease CED3 inaktiv. Ein apoptoseauslösendes Signal führt zur Dissoziation von CED9, woraufhin CED9 im Komplex mit CED4 aktiviert werden kann. Ein weiterer Regulator ist Egl-1, das CED9 bindet und dieses Protein somit vom CED3/CED4-Komplex entfernt, woraufhin CED3 aktiviert wird (Abb.1.1; Vaux 1997).

ⁱ CED: Cell Death abnormal

Das Grundprinzip dieser Regulation ist bei höheren Organismen ähnlich, wenngleich wesentlich komplexer. Die Aufgaben werden dort von entsprechenden Säugerhomologen für das pro-apoptotische CED3 (Caspasen; Yuan et al. 1993), das pro-apoptotische CED4 (Apaf-1; Zou et al. 1997), das anti-apoptotische CED9 (Bcl-2; Hengartner & Horvitz 1994) und das pro-apoptotische Egl-1 (BH3-only Proteine; Conradt & Horvitz 1998) übernommen.

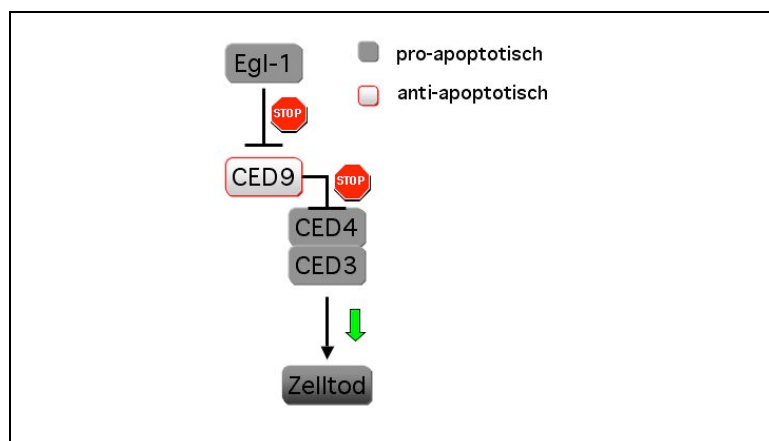


Abb. 1.1:

Grundprinzip der Apoptose in *C. elegans*

Das anti-apoptotische CED9 hält den Komplex aus CED4 und CED3 inaktiv. Egl-1 bindet und inaktiviert CED9, der CED4/CED3-Komplex wird frei, und aktives CED3 leitet den physiologischen Zelluntergang ein.

1.1.3 Molekulare Maschinerie der Apoptose in Säugern

1.1.3.1 Apoptoseausführende Moleküle: Die Familie der Caspasen

Die meisten apoptoseauslösenden Stimuli führen zur Aktivierung der CED3-Homologe, der sog. Caspasen, welche in der Enzymfamilie der Cystein-Proteasen, die nach einem Aspartatrest spalten (caspase = cystein aspartyl protease), zusammengefasst werden (Cohen 1997, Salvesen & Abrams 2004). Das erste identifizierte CED3 Säuger-Homolog war die Caspase-1 (Interleukin-1 β converting enzyme). Inzwischen sind mehr als 10 weitere an der Apoptose beteiligte Mitglieder dieser Familie in Säugern bekannt. Dabei werden Caspase-2, -8, -9 und -10 in der Gruppe der Initiatorcaspasen und Caspase-3, -6 und -7 in der Gruppe der Effektor- bzw. Exekutionscaspasen zusammengefasst (Thornberry 1997).

Caspasen werden in der Regel als inaktives Zymogen synthetisiert, bestehend aus N-terminaler Prodomäne und C-terminaler Proteasedomäne. Durch Dimerisierung und/oder proteolytische Spaltung zwischen der sog. großen und kleinen Untereinheit sowie Abspaltung der Prodomäne wird die Caspase aktiviert. Die Spaltung kann durch Autoaktivierung, durch andere Caspasen (Caspase-Kaskade) oder durch andere Proteinase wie z.B. Granzym B erfolgen. Nach der Prozessierung bilden zwei große und zwei kleine Untereinheiten einen heterotetrameren Komplex und damit das aktive Enzym (Earnshaw et al. 1999). Apikale Caspasen (Caspase-8, -9 und -10) erlangen ihre Aktivität zunächst durch

eine Dimerisierung, welche dann durch proteolytische Spaltung stabilisiert wird (Boatright & Salvesen 2003; Caspase-8-Aktivierung vgl. auch 1.1.3.3).

Die Initiatorcaspasen-8 und -10 sind durch eine Todeseffektordomäne (DEDⁱ) in ihrer Prodomäne gekennzeichnet, mit welcher sie an DED-haltige Adaptorproteine wie z.B. FADDⁱⁱ binden (Abb. 1.2). Caspase-9 hingegen besitzt eine CARDⁱⁱⁱ-Domäne in der Prodomäne, mit der sie z.B. an das ebenfalls mit einer CARD-Domäne ausgestattete Apaf-1 bindet (Hofmann 1999).

Effektorcaspasen sind die apoptoseausführenden Enzyme, d.h. sie hydrolysieren eine Reihe zellulärer Substrate, was zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen und schließlich zum Zelltod führt (Nicholson 1999). Substrate können z.B. ICAD^{iv}, PARP^v (Gu et al. 1995), Gelsolin (Aktin-Zytoskelett) (Kothakota et al. 1997), Lamin-A (Strukturprotein der Kernmembran; Rao et al. 1996), aber auch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L, die dabei ihre apoptosehemmende Wirkung verlieren, sein (Stroh & Schulze-Osthoff 1998). Die Proteolyse von ICAD erlaubt der an den Inhibitor ICAD gebundenen Nuclease CAD in den Kern zu translozieren, um dort die genomische DNA zu spalten. Dies führt zur apoptosetypischen DNA-Fragmentierung (Enari et al. 1998).

Die Spezifität der Caspasen hängt von der Sequenz ihrer Spaltungsmotive ab. Neben ihrer wichtigen Rolle in der Ausführung der Apoptose haben Caspasen auch apoptoseunabhängige Aufgaben. So ist die Caspase-8 auch ein Mediator der T-Zellproliferation (vgl. 1.2.2.8).

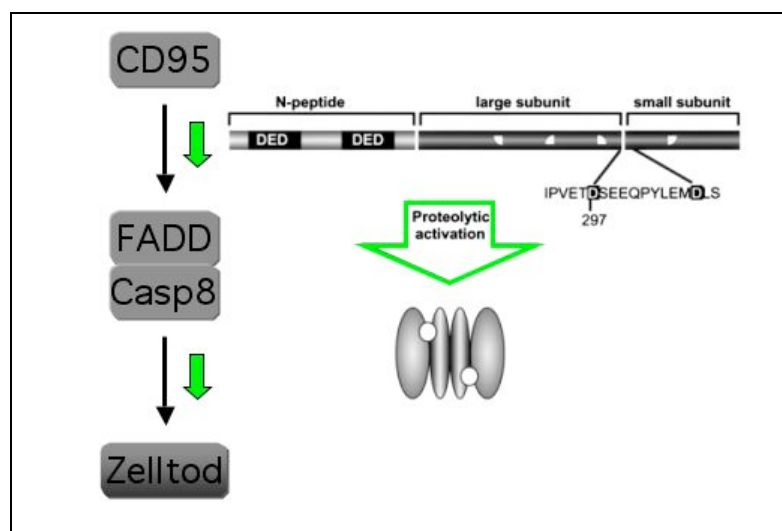


Abb. 1.2:
Mechanismus der Caspase-Aktivierung in Säugerzellen

Die Caspase-Kaskade wird über extrazelluläre Signale (Hormone, Strahlung, Chemotherapeutica etc.) in Gang gesetzt. Nach Aktivierung z.B. des Todesrezeptors CD95 bildet sich ein Komplex aus FADD und Caspase-8. Dabei kommt es zur autokatalytischen Selbstspaltung der Initiatorcaspase, zur proteolytischen Spaltung der Effektorcaspasen und schließlich zur Spaltung zellulärer Substrate, was zu den morphologischen Veränderungen und zum apoptotischen Zelltod führt.

ⁱ DED: Death Effector Domain

ⁱⁱ FADD: Fas Associated protein with a Death Domain

ⁱⁱⁱ CARD: Caspase Recruitment Domain

^{iv} ICAD: Inhibitor of Caspase Activated DNase

^v PARP: Poly-ADP-Ribose Polymerase

1.1.3.2 Intrinsischer Signalweg über die Mitochondrien und die Bildung des Apoptosoms

Kommt es z.B. über die p53-Aktivierung durch DNA-Schädigung zu einem apoptotischen Signal, hat dies die Aktivierung und Integration pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bax, Bak) in die mitochondriale Membran zur Folge. Die Konsequenz daraus ist die Freisetzung verschiedener Moleküle aus den Mitochondrien. Zu den freigesetzten Molekülen gehören u.a. Cytochrom c, welches normalerweise im Intermediärraum an der Atmungskette beteiligt ist, aber auch AIFⁱ (Lorenzo et al. 1999), Smac (Du et al. 2000)/DIABLO (Verhagen et al. 2000) und Omi/HtrA2 (Hegde et al. 2002).

Über den Mechanismus der Freisetzung existieren mehrere Theorien, wobei eine von der Öffnung eines Megakanals (PTPⁱⁱ) ausgeht. Ein zweites Modell sieht die Ursache für die Freisetzung in der Hyperpolarisierung der inneren Mitochondrienmembran. Im Zusammenhang mit einer weiteren Theorie wird davon ausgegangen, dass Bax-Oligomere einen Kanal bilden, während Vertreter eines vierten Modells annehmen, dass Bax mit VDACⁱⁱⁱ kooperiert, um einen Cytochrom c-Freisetzungskanal zu bilden (Shimizu et al. 2001). Dabei bleibt zu beachten, dass die mitochondriale Depolarisierung nicht zwingend in jeder Zelle vor der Cytochrom c-Freisetzung stattfinden muss, vielmehr bestehen hier zelltypspezifische Unterschiede.

Das freigesetzte Cytochrom c bindet mit großer Wahrscheinlichkeit an WD-40-„Repeats“ im Apaf-1^{iv}-Molekül (Srinivasula et al. 1998, Zörnig et al. 2001). Dieses interagiert daraufhin nach ATP-Bindung und Konformationsänderung mit seiner CARD-Domäne mit der CARD-Domäne in der Prodomäne der Caspase-9. Aus mehreren Apaf-1- und Procaspase-9-Molekülen bildet sich ein Holoenzym, dessen katalytische Untereinheit aus der Caspase-9 besteht und bei dem Apaf-1 als allosterischer Regulator dient. Diese sogenannte Apoptosombildung induziert die autokatalytische Aktivierung der Caspase-9, die daraufhin Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) aktiviert (Abb. 1.3; Rodriguez & Lazebnik 1999).

ⁱ AIF: Apoptosis Inducing Factor

ⁱⁱ PTP: Permeability-Transition Pore

ⁱⁱⁱ VDAC: Voltage-Dependent Anion Channel

^{iv} Apaf-1: Apoptotic protease activating factor -1

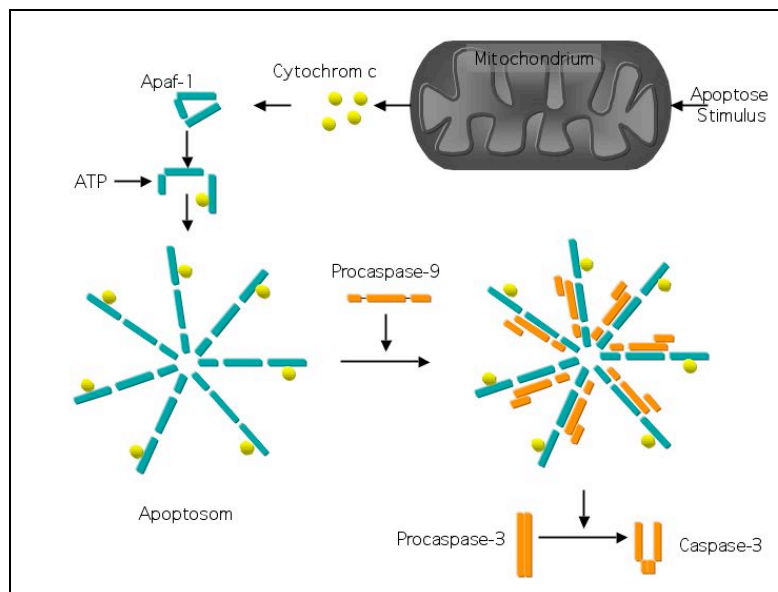


Abb. 1.3

Die Aktivierung des intrinsischen Signalweges führt zur Apoptosombildung

Ein interner Apoptosestimulus führt über die Beteiligung pro-apoptischer Bcl-2-Familienmitglieder zur Cytochrom c- Freisetzung. Sieben Apaf-1-Moleküle (Acehan et al. 2002) bilden zusammen mit Procaspase-9 einen Multimerkomplex (das Apoptosom), in dem Caspase-9 aktiviert wird. Diese induziert wiederum durch proteolytische Spaltung die Aktivierung von Effektorcaspasen wie z.B. die Caspase-3.

Die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien führt zu caspaseunabhängigen, aber apoptosecharakteristischen Veränderungen im Zellkern. Das neben Cytochrom c und AIF ebenfalls aus den Mitochondrien entlassene Smac/DIABLO löst die Apoptose aus, indem es die Caspase-9-Inhibierung durch IAPsⁱ rückgängig macht. Die Mitglieder der stark konservierten IAP-Familie hemmen durch eine direkte Interaktion mit Caspasen, wodurch diese inhibiert werden (vgl. 1.1.4.4).

1.1.3.3 Extrinsischer Apoptoseweg bzw. rezeptorvermittelte Apoptose

Die Rezeptoren der TNF-Familieⁱⁱ erfüllen zusammen mit ihren Liganden verschiedene Funktionen. So können sie z.B. die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Immunzellen auslösen bzw. beeinflussen (Ashkenazi 2002). Die Rezeptoren dieser Familie sind TypI-Transmembranproteine, die ihre Signale nach der Ligandenbindung meist in Form eines trimeren oder multimeren Komplexes übertragen. Zudem existieren auch aus proteolytischer Spaltung resultierende lösliche Formen (z.B. DcR3). Die zu den Rezeptoren gehörenden Liganden sind in der Regel TypII-Transmembranproteine bzw. homotrimere lösliche Moleküle. Die Aktivierung der sog. „Todesrezeptoren“ der TNF-Superfamilie (TNF-R1, CD95, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2) nach Bindung des zugehörigen Liganden führt zur Auslösung der Caspasekaskade und damit zur Apoptose. Allen Todesrezeptoren gemein ist die intrazelluläre DDⁱⁱⁱ bzw. Todesdomäne, die das Rezeptorsignal über Interaktion mit anderen DD-haltigen Proteinen (z.B. FADD, TRADD) weitergibt (Ashkenazi & Dixit 1998). Am Beispiel der

ⁱ IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein

ⁱⁱ TNF: Tumor Nekrose Faktor

ⁱⁱⁱ DD: Death Domain

CD95/Fas/Apo-1-vermittelten Apoptose soll die der Aktivierung folgenden Ereigniskette genauer beschrieben werden:

Der CD95-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und der intrazellulären Todesdomäne (DD; Wallach et al. 1999). Kommt es zu einer Aktivierung durch den CD95-Liganden (CD95L), werden intrazellulär Signalmoleküle an den Rezeptor rekrutiert. Dieser Komplex, u.a. bestehend aus FADD und Procaspase-8, wird als DISCⁱ bezeichnet (Kischkel et al. 1995). FADD ist ein Adaptorprotein und beinhaltet nicht nur die C-terminale Todesdomäne, sondern auch eine DEDⁱⁱ am N-terminalen Ende. Über diese Domäne (DED) rekrutiert FADD Procaspase-8, welche ebenfalls DEDs besitzt, in den Signalkomplex. Nach dieser Rekrutierung erhöht sich die lokale Caspase-8-Konzentration, und es kommt zur autokatalytischen Selbstprozessierung und Aktivierung („induced proximity“; Muzio et al. 1998). Eine Konformationsänderung in der Region zwischen Prodomäne und großer Untereinheit führt zur Abspaltung und Freisetzung der reifen Caspase-8 in das Zytosol (Chang et al. 2003; Abb. 1.4).

Tritt aktive Caspase-8 in ausreichender Menge auf, setzt sie die proteolytische Kaskade in Gang und aktiviert rasch Effektorcaspasen, wie z.B. Caspase-3 (TypI-Zellen). In manchen Zelltypen (TypII-Zellen) kommt es allerdings nur zur schwachen und langsamen DISC-Bildung, und die Menge an aktiver Caspase-8 reicht nicht aus, um die Effektorcaspasen direkt zu aktivieren (Scaffidi et al. 1998). Diese TypII-Zellen benötigen eine Amplifizierung über den mitochondrialen Signalweg, um schließlich Apoptose auslösen zu können. Die am DISC generierte Caspase-8-Aktivität genügt, um das Bcl-2 Familienmitglied Bid in tBidⁱⁱⁱ zu spalten (Li et al. 1998), welches daraufhin zu den Mitochondrien transloziert und zusammen mit weiteren pro-apoptotisch wirkenden Familienmitgliedern (Bax, Bak) zur Aktivierung der intrinsischen Signalkette (vgl. 1.1.3.2) und der Aktivierung der Effektorcaspasen führt (Eskes et al. 2000). Demzufolge ist die todesrezeptorvermittelte Apoptose in diesem Zelltyp durch anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder, wie z.B. Bcl-2, blockierbar (vgl. 1.1.4.3).

ⁱ DISC: Death Inducing Signaling Complex

ⁱⁱ DED: Death Effector Domain

ⁱⁱⁱ tBid: truncated Bid

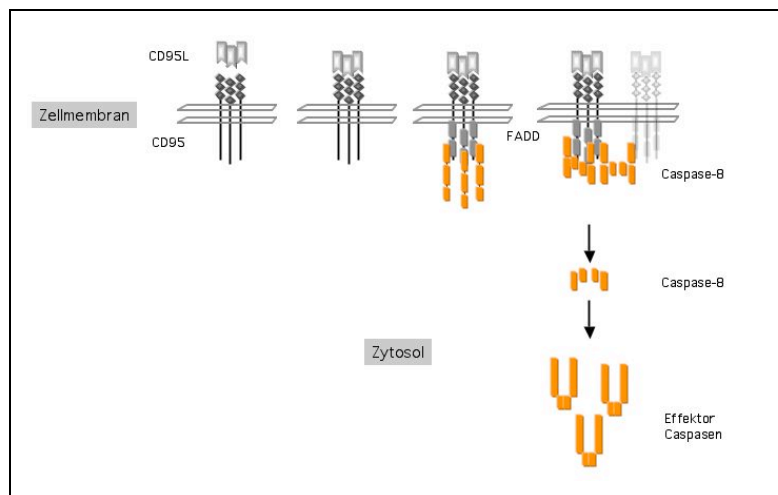


Abb. 1.4

CD95-vermittelte Apoptosekaskade

Der Ligand (Trimer, CD95L) bindet an den Rezeptor (Trimer, CD95). Daraufhin bindet intrazellulär das Adaptorprotein FADD, welches Procaspase-8 mit in den Komplex rekrutiert. Zwei Procaspase-8 Moleküle dimerisieren, während das dritte Caspase-Molekül vermutlich mit einer Caspase im Nachbarkomplex dimerisiert und somit zwei Komplexe miteinander vernetzt. Nach einer Konformationsänderung kommt es zur Abspaltung der Prodomäne, die reife Caspase wird ins Zytosol entlassen und aktiviert dort die Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3).

1.1.3.4 TRAIL und seine Rezeptoren

Eine weitere interessante Untergruppe der TNF-Rezeptoren ist die Gruppe der TRAIL-Rezeptoren (DR4, DR5, DcR1, DcR2, Osteoprotegerin) mit ihrem Liganden TRAILⁱ, welcher als membranständiges Protein synthetisiert wird und, wie CD95L auch, als löslicher Ligand abgespalten werden kann. Viele humane Tumorzellen sind im Gegensatz zu normalen Zellen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose sensitiv (Walczak et al. 1999). Während die apoptoseauslösenden Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) in den meisten Geweben sowie Tumorzellen exprimiert werden, geschieht dies zusammen mit den „decoy“ Rezeptoren TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) hauptsächlich in gesundem Gewebe. Dies könnte mit einer Rolle darin spielen, dass die Aktivierung der Rezeptoren DR4 und DR5, die Apoptose analog zu CD95 über die Signalmoleküle FADD und Caspase-8 induzieren, in gesundem Gewebe verhindert wird (Pan 1997). Jedoch besitzt DR5 die höchste Affinität zum Liganden, daher ist wahrscheinlicher, dass in gesunden Zellen die trimeren Rezeptorkomplexe keine Apoptose auslösen, da hierzu multimeren Komplexe von Nöten wären, während Tumorzellen bereits durch eine Trimerisierung die Apoptosesignalkaskade aktivieren (Ashkenazi 2002). Das sekretierte Osteoprotegerin stellt einen weiteren „decoy“ Rezeptor der TRAIL-Rezeptor Familie dar, dessen physiologische Rolle noch unklar ist (Emery et al. 1998).

1.1.4 Regulation der CD95-vermittelten Apoptose

Die apoptotische Signalkaskade des CD95 muss genauestens reguliert sein, da fehlende oder übermäßige Apoptose verheerende Folgen hat (vgl. 1.1.5). So können an verschiedenen Stellen inhibitorische, aber auch aktivierende Moleküle eingreifen.

ⁱ TRAIL: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

1.1.4.1 Hemmung auf der Stufe der Ligandenbindung („Decoy“ Rezeptoren)

Eine Möglichkeit, CD95L-induzierte Apoptose zu hemmen, besteht über die lösliche CD95-Form (DcR3ⁱ/TR6), die mit CD95 um den Liganden konkurriert und somit das Auslösen der Signalkaskade verhindert (Cheng et al. 1994). Das *DcR3*-Gen wird z.B. in vielen Kolonkarzinomarten überexprimiert (Pitti et al. 1998) und die Sekretion seines Genprodukts nimmt mit Fortschreiten der Karzinogenese weiter zu (Takahama et al. 2002, Ugurel et al. 2001). Die Tumorzelle wird durch die Sekretion von DcR3 vor Tumor-reaktiven T-Zellen geschützt (Roth et al. 2001). Neben CD95L bindet DcR3 auch die TNF-Familienmitglieder LIGHT und TL1A (Migone et al. 2002).

1.1.4.2 Hemmung auf der Stufe der Caspase-8-Aktivierung im DISC

Ein zu Caspase-8 homologes, aber inhibitorisches Molekül ist FLIPⁱⁱ, welches ursprünglich in einer Vielzahl von Viren (v-FLIP) nachgewiesen wurde (Thome et al. 1997). Vom zellulären Homolog c-FLIP existieren verschiedene Spleißvarianten, von denen bisher zwei als Proteine nachgewiesen wurden (Irmeler et al. 1997). Das 55 kDa schwere c-FLIP_{long} (c-FLIP_L) ist mit zwei N-terminalen DEDs und einer Caspasedomäne der Caspase-8 sehr ähnlich, jedoch besitzt die Caspasedomäne des c-FLIP aufgrund einer Mutation keine enzymatische Aktivität.

Das nur 26 kDa schwere c-FLIP_{short} (c-FLIP_S) hingegen besteht, entsprechend der viralen v-FLIP Form, lediglich aus zwei DEDs. Beiden Varianten (FLIP_L und FLIP_S) gemein ist, dass sie über ihre DE-Domänen an FADD zum DISC aktivierter Todesrezeptoren rekrutiert werden und somit Apoptose hemmen (Krueger et al. 2001). In Heterodimeren mit Caspase-8 erlaubt FLIP_L die erste Abspaltung des p10 Fragmentes, die weitere Caspase-8-Prozessierung wird jedoch verhindert. FLIP_L wird im DISC selbst, entsprechend der Caspase-8, in ein p43 und ein p12 Fragment gespalten und das Verhältnis von FLIP_L zu Caspase-8 ist ausschlaggebend darüber, ob die Signalübertragung an diese Stelle gehemmt wird oder nicht (Scaffidi et al. 1999). Wird FLIP_S mit in den CD95-DISC rekrutiert, lässt dies keine Caspase-8-Spaltung zu. Erhöhte FLIP_S Mengen spielen möglicherweise in der T-Zellaktivierung eine Rolle, bei der sie aktivierte T-Zellen u.U. vor aktivierungsinduziertem Zelltod (AICDⁱⁱⁱ) schützen (Kirchhoff et al. 2000). Es gibt Anzeichen dafür, dass FLIP_S auch am Überleben aktivierter T-Zellen, die dann zu Gedächtniszellen werden, beteiligt ist (Oehme et al., Manuskript in Vorbereitung).

FLIP_L zeigt allerdings nicht nur anti-apoptotische Wirkung. Neueren Untersuchungen zufolge kann es

ⁱ DcR3: Decoy Receptor 3

ⁱⁱ FLIP: FLICE-Like Inhibitory Protein

ⁱⁱⁱ AICD: Activation Induced Cell Death

auch die Caspase-8-Aktivierung verstärken (Micheau et al. 2002). Möglicherweise spielt das c-FLIP_L-Expressionsniveau eine wichtige Rolle für die Entscheidung, ob das Molekül pro- oder anti-apoptotisch wirkt. Für c-FLIP_S ist bisher ausschließlich ein anti-apoptotischer Einfluss beobachtet worden.

Die FLIP-Proteine scheinen auch an der Inhibition todesrezeptorvermittelter Proliferation beteiligt zu sein (Tai et al. 2004; Oehme et al., Manuskript in Vorbereitung).

1.1.4.3 Regulierung der Apoptose durch Mitglieder der Bcl-2-Familie

Auch die Proteine der Bcl-2-Familie spielen bei der Übermittlung und auch der Hemmung apoptotischer Signale eine wichtige Rolle (Kirkin et al. 2004). Benannt wurde diese Familie nach dem Genprodukt des Onkogens *bcl-2*, welches in 80% der Patienten mit follikulären B-Zelllymphomen, z.T. infolge einer Chromosomentranslokation t(14,18), überexprimiert wird (Bcl: B-cell lymphoma) (Tsujiimoto et al. 1985).

Die Mitglieder dieser Familie werden bezüglich ihres Apoptoseverhaltens in zwei Gruppen eingeteilt: Anti-apoptotisch wirkend sind dabei Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 und A1, während z.B. Bax, Bad, Bak, Bid, Bim und Noxa pro-apoptotisch wirken. Alle Bcl-2-Familienmitglieder besitzen mindestens eine der vier konservierten Domänen BH1-BH4ⁱ (Reed 1997). Die BH3-Domäne ist dabei für die pro-apoptotische Aktivität der Moleküle essentiell. Die Mitglieder der BH3-only-Untergruppe (u.a. Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa) besitzen lediglich die zytotoxische BH3-Domäne (Abb. 1.4; Huang et al. 2000).

Kommt es als Antwort auf ein Apoptosesignal zur Caspase-8-Aktivierung, kann aktive Caspase-8 das BH3-only Bcl-2-Familienmitglied Bid zu tBidⁱⁱ spalten, welches dann zu den Mitochondrien transloziert und dort Bax aktiviert. Bax liegt im inaktiven Zustand als monomere Form im Zytosol vor. Das Apoptose Signal bewirkt auf eine noch nicht verstandene Weise eine Oligomerisierung und die Translokation von Bax zu den Mitochondrien, wo dieses in die mitochondriale Membran integriert wird (Kirkin et al. 2004). Verhindert werden kann dies durch Dimerisierung mit anti-apoptotischen Familienmitgliedern wie Bcl-2 oder Bcl-x_L. BH3-only-Moleküle wiederum binden an die anti-apoptotischen Bcl-2- und Bcl-x_L-Proteine und setzen so Bax und Bak aus den inhibierten Komplexen frei. Dementsprechend bestimmt das Verhältnis der apoptoseinduzierenden zu apoptosehemmenden Bcl-2-Familienmitgliedern, ob Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird (Kirkin et al. 2004). Wie „knockout“-Studien zeigen, besitzen Bax und Bak redundante Funktion. Werden jedoch beide

ⁱ BH: Bcl-2 Homology domain

ⁱⁱ tBid: truncated Bid

Gene deletiert, ist jede Form von Apoptose, die über Aktivierung von BH3-only Proteinen initiiert wird, geblockt (Lindsten et al. 2000).

Für BH3-only Moleküle sind verschiedene Arten der Aktivierung beschrieben worden. Bad beispielsweise wird über Phosphorylierungen reguliert. In seiner phosphorylierten Form bindet es an das zytosolische 14-3-3-Protein und wird dadurch inaktiviert (Korsmeyer 1999). Pro-apoptotische Signale führen zur Bad-Dephosphorylierung, woraufhin das Molekül an anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder bindet und diese inaktiviert

Die BH3-only-Familienmitglieder BIM und BMF sind an einer besonderen Zelltodform beteiligt: Anoikisⁱ. So wird die Form von Apoptose genannt, die auftritt, wenn Zellen sich aus dem Zellverband lösen und Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte verlieren. In gesunden Zellen sind BIM und BMF an das Zytoskelett gebunden, doch sobald sich die Zelle von der extrazellulären Matrix ablöst, werden BIM und BMF freigesetzt und interagieren mit Bcl-2 und Bcl-x_L. Eine fehlerhafte Regulation kann hier zur Anoikisresistenz führen, was die Metastasenbildung erleichtert, da sich vom Primärtumor ablösende Zellen jetzt vor Zelltod geschützt sind (Puthalakath et al. 1999, 2001).

Bcl-2-Familienmitglieder besitzen neben ihrer apoptoseregulierenden Funktion noch andere Aufgaben, z.B. in der Zellzyklusregulation (vgl. 1.2.2.5).

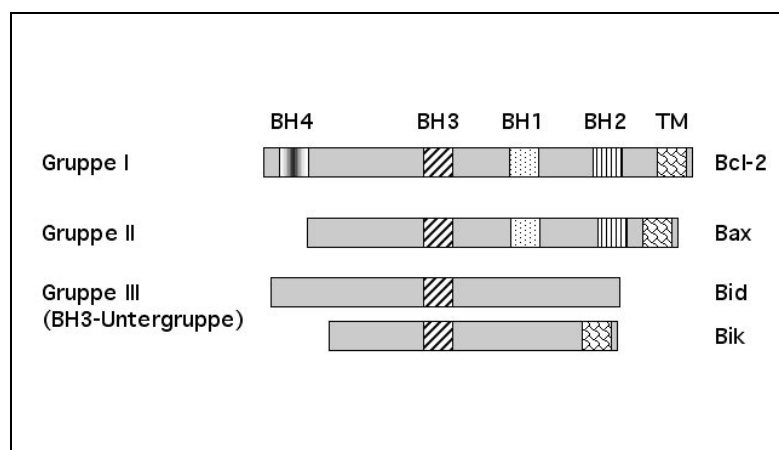


Abb. 1.5

Die Bcl-2-Familie

Bcl-2-Familienmitglieder werden strukturell je nach Vorhandensein der homologen BH-1-4-Domänen in drei verschiedene Gruppen unterteilt. Die Mitglieder der Gruppe I wirken anti-apoptotisch, besitzen die Domänen BH1 bis BH4 und haben ein hydrophobes C-terminales Ende, mit dem sie in Zellmembranen insertieren. In der zweiten Gruppe befinden sich pro-apoptotische Mitglieder mit den Domänen BH1 bis BH3 und einem hydrophoben C-terminalen Ende. Die dritte Gruppe fasst pro-apoptotische Moleküle zusammen, die nur die BH3 Domäne besitzen.

ⁱ Anoikis: griechisch für heimatlos

1.1.4.4 IAPs hemmen Caspasen durch direkte Interaktion mit Caspase-9, -7, -3

Eine weitere Familie apoptoseregulierender Moleküle ist die der IAPsⁱ. Sie wurden zunächst als baculovirale Proteine identifiziert (Crook et al. 1993), inzwischen jedoch sind Homologe in diversen Spezies bis hin zum Menschen bekannt (Salvesen & Duckett 2002). Allen gemeinsam ist, dass sie häufig eine RING und mindestens eine der drei BIRⁱⁱ-Domänen besitzen. Die RING-Domäne ist eine Strukturdomäne, die in vielen IAP-Proteinen gefunden wird und die E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität zeigt. Proteine mit dieser Domäne können den eigenen Abbau oder den auserwählter Zielproteine durch Ubiquitinierung auslösen. Die BIR-Domänen sind essentiell für die anti-apoptotischen Eigenschaften der IAPs, denn über diese Region binden und inaktivieren sie Caspasen. Zu den IAPs der Säugerzellen gehören z.B. XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP und Survivin (Abb. 1.6). XIAP, c-IAP1 und cIAP2 inhibieren direkt Caspase-3, Caspase-7 und Caspase-9. Am Besten untersucht ist dabei das XIAP-Molekül, welches mit der BIR3-Domäne direkt an die kleine Untereinheit der Caspase-9 bindet. Die BIR2-Domäne interagiert mit Caspase-3 und Caspase-7 (Deveraux & Reed 1999).

Die Aktivität der IAPs ist nicht nur auf die Inhibierung von Caspasen beschränkt, sondern spielt auch eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulierung (v.a. Mitose und Zytokinese), im Proteinabbau (Ubiquitinierung von z.B. TRAF2) und in caspaseunabhängigen Signaltransduktionskaskaden (JNK-Signalweg). Die Expression von c-IAP2 und XIAP wird u.a. durch NF-κB reguliert. Die Survivin-Expression wird zellzyklusabhängig kontrolliert und dabei am Übergang von G2/M induziert (vgl. 1.2.2.7; Salvesen & Duckett 2002)).

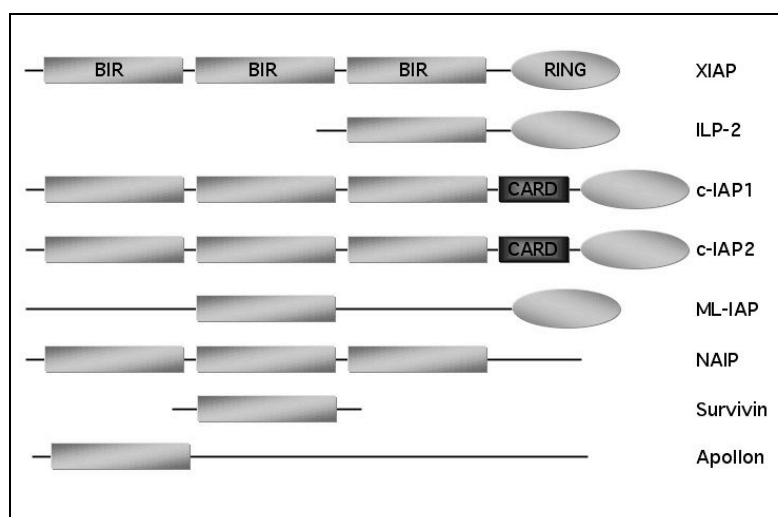


Abb. 1.6

Die IAP-Familie

Die Mitglieder der IAP-Familie sind durch den Besitz mindestens einer BIR-Domäne und eventuell einer RING-Domäne gekennzeichnet. Über die BIR-Domänen können IAPs mit Caspasen interagieren. Die RING-Domäne besitzt E3-Ligaseaktivität und führt zum Abbau von den IAPs selbst, aber auch von auserwählten Zielproteinen.

ⁱ IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein

ⁱⁱ BIR: Baculovirus IAP Repeat

1.1.4.5 IAP-regulierende Proteine

Die Regulation der IAPs wird durch bestimmte Proteine gesteuert, zu denen u.a. Smac/DIABLO (Du et al. 2000, Verhagen et al. 2000) und Omi/HtrA2 (Hegde et al. 2002) gehören. Smacⁱ befindet sich in nicht-apoptotischen Zellen im Intermembranraum der Mitochondrienmembranen und wird im Verlaufe der apoptotischen Signalkaskade zusammen mit Cytochrom c freigesetzt. Weiterhin bindet es über seine IBMⁱⁱ-Domäne z.B. an XIAP und führt somit zur Apoptose der Zelle, indem die vorher an XIAP gebundene Caspase nun freigesetzt wird.

Wie bereits beschrieben, lässt sich der rezeptorvermittelte Apoptoseweg in TypII-Zellen über eine Blockierung des mitochondrialen Signalweges hemmen. Neben der Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung kommt es dementsprechend auch nicht zur Freisetzung von Smac, was zur Folge hat, dass Caspase-3 nur unvollständig prozessiert wird, da XIAP nach Bindung an Caspase-3 die weitere Spaltung verhindert. Ein zweites Signal (= Freisetzung von Smac und Bindung an XIAP) und damit die Aktivierung von Caspase-3 bleiben dabei aus.

Ein weiteres Säugerprotein mit einer IBM-Domäne ist Omi/HtrA2. Omi ist eine Serin-Protease, die ebenfalls z.B. an XIAP bindet und so den Zelltod reguliert. Sie wird nach einem apoptotischen Stimulus zusammen mit Cytochrom c und Smac aus den Mitochondrien entlassen und führt über die Inhibierung der IAPs, aber auch über seine Proteaseaktivität, zum Untergang der Zelle (Hedge et al. 2002).

1.1.4.6 PI3K und Akt verhindern den Zelltod

Signalwege, die zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB führen, hemmen den apoptotischen Zelltod. Wachstumsfaktoren wie EGFⁱⁱⁱ und PDGF^{iv} oder Zytokine wie IL-2 und IL-3 aktivieren über die Ras-GTPase den PI3K/Akt Signalweg, welcher u.a. Apoptose, bedingt durch Wachstumsfaktorentzug, UV-Strahlung, DNA Schäden oder CD95L, inhibiert (Vivanco & Sawyers 2002).

ⁱ Smac: Second mitochondrial activator of caspases

ⁱⁱ IBM: IAP binding motif

ⁱⁱⁱ EGF: Epidermal Growth Factor

^{iv} PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

Die Autophosphorylierung ligandenaktivierter Rezeptortyrosinkinasen führt zur Rekrutierung einer inaktiven PI3Kⁱ. Es folgt deren Aktivierung, indem die regulatorische Untereinheit p85 die katalytische Untereinheit p110 freisetzt. Anschließend phosphoryliert die nun aktive p110-Untereinheit PIP₂ⁱⁱ zu PIP₃ⁱⁱⁱ. Letzteres wiederum aktiviert PIP₃-abhängige Kinasen (PKD), welche daraufhin Akt/PKB an Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren. Die nun aktive Akt-Kinase interagiert direkt mit apoptosebeteiligten Proteinen und inaktiviert diese. So phosphoryliert Akt z.B. Bad, Caspase-9 und Forkhead-Transkriptionsfaktoren (AFX, FKHRL1), welche die Transkriptionsaktivität von Promotoren apoptoseinduzierender Gene (CD95L, IKK α) kontrollieren (Datta et al. 1997). In vielen Tumoren führen Mutationen im *PTEN* Gen zur konstitutiven Akt-Aktivierung, denn die Phosphatase PTEN überführt normalerweise PIP₃ in die inaktive PIP₂-Form zurück (Vivanco & Sawyers 2002).

PI3K aktiviert Akt-unabhängig über den p110-PIP₃-Weg, aber auch über eine direkte Assoziierung der p85-Untereinheit, die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac, was eine Neuordnung des Aktinzytoskeletts zur Folge hat (Vivanco & Sawyers 2002). In T-Zellen hemmt die PI3K die Caspase-8-Aktivierung im DISC, indem die Kinase die aktinabhängige laterale Diffusion der CD95-Moleküle, vermutlich über die Aktivierung von Rho-GTPasen verhindert. Folglich kommt es nicht zur Vernetzung einzelner DISC-Komplexe und nur zu unzureichender Caspase-8-Aktivierung (Vardhachary et al. 2001).

1.1.4.7 Regulierung der Apoptose durch PKC-Isoformen

Die PKC-Familie, bestehend aus 10 Serin/Threonin-Proteinkinasen, ist an der Regulierung vieler unterschiedlicher Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Die einzelnen Isoformen werden nach dem Mechanismus ihrer Aktivierung in drei Untergruppen eingeteilt, wobei alle Isoformen das negativ geladene Membranphospholipid Phosphatidylserin zur Aktivierung benötigen (Gutcher et al. 2003). Die Gruppe der konventionellen PKCs (cPKC: α , β_1 , β_2 und γ) und der neuen PKCs (nPKC: δ , ϵ , η und θ) brauchen zusätzlich die Bindung an DAG^{iv}. Das Lipid DAG wird durch Hydrolyse von Inositolphospholipiden durch Phospholipase C (PLC) produziert. Unterscheiden lassen sich diese beiden Untergruppen dadurch, dass sie DAG jeweils calciumabhängig (cPKC) oder calciumunabhängig (nPKC) binden. Eine dritte Untergruppe, die atypischen PKCs (aPKC: ζ und λ/ι) benötigen lediglich Phosphatidylserin zur Aktivierung (Gutcher et al. 2003).

ⁱ PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

ⁱⁱ PIP₂: PtdIns(4,5)P₂

ⁱⁱⁱ PIP₃: PtdIns (3,4,5)P₃

^{iv} DAG: Diacylglycerol

Die apoptotischen Eigenschaften der PKC-Isoformen sind sehr unterschiedlich: Während die konventionellen und atypischen PKCs in der Regel als anti-apoptotisch eingestuft werden können, besitzt die Gruppe der nPKCs eine hauptsächlich pro-apoptotische Funktion (Cross et al. 2000). Hierbei am Besten untersucht sind PKC α und PKC β . Erstere phosphoryliert und stabilisiert z.B. Bcl-2 (Meinhardt et al. 2000) und Raf-1. Raf-1 wiederum vermittelt u.a. die anti-apoptotische Funktion von Akt/PKB (Majewski et al. 1999). Die Aktivierung der cPKCs führt auch zur Suppression der todesrezeptorvermittelten Apoptose, da es infolge der PKC-Aktivierung durch noch ungeklärte Mechanismen nicht zur Rekrutierung von FADD in den DISC und somit nicht zur Weiterleitung des Apoptosesignals kommt (Gomez-Angelats & Cidlowski 2001, Harper et al. 2003). Ein PKC β_2 Knockout-Maus-Modell zeigt, dass diese Kinase eine essentielle Funktion in der Aktivierung von NF- κ B und somit für NF- κ B-abhängige Überlebenssignale in B-Lymphozyten besitzt (Su et al. 2002).

Die Untergruppe der nPKCs ist an der Stimulation und Ausführung der Apoptose beteiligt, indem PKC δ z.B. durch Todesrezeptoren (Mizuno et al. 1997), UV-Strahlung (Denning et al. 1998) und Etoposid (Reyland et al. 1999) aktiviert wird. Entsprechend führt ein Verlust der PKC δ -Expression zur Apoptoseinhibition und zum Tumorwachstum (Lu et al. 1997). Diese Kinase wird zusätzlich von Caspase-3 gespalten, was zur Dissoziation der aktiven Untereinheit führt (Emoto et al. 1995) und sie ist an apoptosecharakteristischen Prozessen im Nukleus beteiligt, wie z.B. der Phosphorylierung des Strukturproteins Lamin B (Cross 2000).

Die Signalübertragungswege der Apoptose und ihre Regulierung sind in der folgenden Abbildung (Abb. 1.7) zusammenfassend dargestellt.

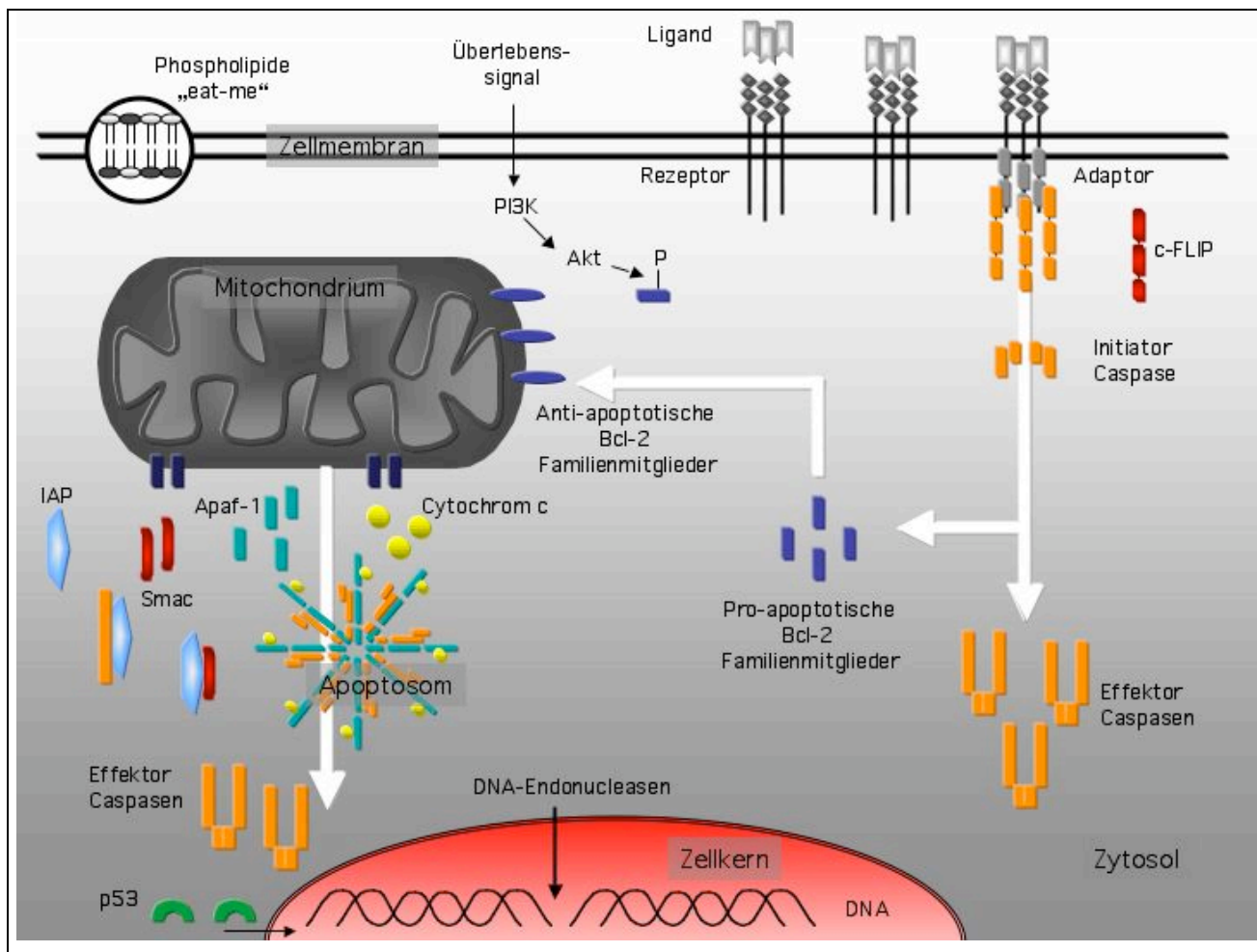


Abb. 1.7 Signalübertragungswege der Apoptose und Möglichkeiten der Inhibierung

Nach Bindung eines trimerisierten Todesliganden an seinen Rezeptor kommt es intrazellulär zur Komplexbildung und damit zur Aktivierung der Initiatorcaspase. Dies kann direkt die Aktivierung der Effektorcaspasen zur Folge haben (Typ I) oder indirekt über den mitochondrialen Weg zur Apoptosombildung führen, wodurch dann Caspase-9 aktiviert wird, welche daraufhin Effektorcaspasen aktiviert (Typ II). Effektorcaspasen bedingen die apoptotischen Veränderungen der Zellen. So aktivieren sie Endonucleasen wie CAD, die im Zellkern DNA fragmentieren. Das Tumorsuppressorprotein p53 führt über transkriptionsabhängige und -unabhängige Mechanismen zur Apoptose. Überlebenssignale, die durch Rezeptoren auf der Oberfläche übermittelt werden, bedingen die Aktivierung der Akt-Kinase. Diese phosphoryliert und inaktiviert pro-apoptische Bcl-2-Familienmitglieder. IAPs hemmen Caspasen, während Smac wiederum nach Freisetzung aus den Mitochondrien in der Lage ist, IAPs zu blockieren. Im Verlaufe der Apoptose kommt es zur Translokation bestimmter normalerweise intrazellulär lokalisierter Phospholipide an die Außenseite der Membran. Dies stellt ein „eat-me“ Signal für benachbarte Zellen dar, die daraufhin die apoptotische Zelle phagozytieren.

1.1.5 Apoptose und Pathologie

Eine Deregulierung von Apoptose ist bei einer Vielzahl von Krankheiten, wie z.B. Krebs, Autoimmunerkrankungen (z.B. ALPS), Herzinfarkt, Diabetes, neurodegenerativen Krankheiten (z.B. Alzheimer, Parkinson) und viralen Infektionen (z.B. AIDS) beteiligt.

1.1.5.1 Apoptosebedingte Krankheiten des Immunsystems

Apoptose ist ein fundamentaler Prozess in der Regulierung des Immunsystems, und ein fehlerhafter Ablauf führt zu ernsthaften Erkrankungen. So bedingen Punktmutationen in *lpr*ⁱ (fehlerhafte DD von CD95) oder *gld*ⁱⁱ (fehlerhafter C-Terminus des CD95L) Mäusen aufgrund der verhinderten CD95-Signalübertragung eine Akkumulierung aktivierter T-Zellen (Nagata & Suda 1995).

Im Menschen führt eine entsprechende Dysfunktion des CD95-CD95L-Systems zu einem ähnlichen Syndrom: ALPSⁱⁱⁱ. Kinder mit ALPS zeigen massive nicht-maligne Lymphadenopathie, eine veränderte und vergrößerte T-Zellpopulation sowie Autoimmunität. Die Autoimmunerkrankung resultiert womöglich aus der Unfähigkeit des Immunsystems selbst-reaktive Lymphozyten durch Apoptose zu entfernen (Lenardo 2003).

1.1.5.2 Apoptose und AIDS

Kennzeichnend für die Immunschwächekrankheit AIDS^{iv} ist die Abnahme der CD4⁺ T-Helferzellpopulation durch übermäßige Apoptose (Gougeon et al. 1998). Dabei sterben nicht nur infizierte, sondern viele nicht-infizierte T-Zellen, was u.a. daraus resultiert, dass das virale Genprodukt HIV-1 Tat, welches von infizierten Zellen gebildet wird, in nicht-infizierte Zellen eindringt und sie zur T-Zell-Rezeptor-induzierten CD95-vermittelten Apoptose sensibilisiert. Zusätzlich erhöht Tat, ähnlich wie Nef (ein weiteres HIV Genprodukt) die CD95L-Expression an infizierten Zellen. CD95L interagiert mit CD95 auf der Oberfläche nicht infizierter T-Zellen und löst somit die Apoptosekaskade in diesen Zellen aus (Krammer 2000). Im Einzelnen ist das massive Absterben nicht-infizierter T-Zellen durch Apoptose noch nicht verstanden.

1.1.5.3 Apoptose und Tumorerkrankungen

Krebszellen sind u.a. durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet: Sie empfangen permanent Wachstumssignale, und sind dabei resistent gegenüber wachstumshemmenden Signalen. Sie zeigen eine nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit, besitzen die Fähigkeit, Metastasen zu bilden und sich mit Blutgefäßen zu versorgen. Was zusätzlich maßgeblich zum Tumorwachstum statt zur Eliminierung

ⁱ lpr: lymphoproliferation

ⁱⁱ gld: generalized lymphoproliferative disease

ⁱⁱⁱ ALPS: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome

^{iv} AIDS: Acquired Immuno Deficiency Syndrome

transformierter Zellen führt, ist der Verlust der Apoptosesensitivität in Krebszellen (Hanahan & Weinberg 2000). Dies soll anhand zweier Beispiele, dem Onkogen Bcl-2 und dem Tumorsuppressor p53, verdeutlicht werden:

Das *bcl-2* Onkogen fördert das Überleben von Zellen. Eine Überexpression infolge einer t(14;18) chromosomalen Translokation prädisponiert für die Entwicklung follikulärer B-Zelllymphome beim Menschen (Limpens et al. 1995). Zusätzlich sind erhöhte Bcl-2-Mengen in einer Reihe weiterer Krebserkrankungen (z.B. Brust-, Darm-, Lungenkrebs) nachweisbar (Kirkin et al. 2004). In transgenen Mauszellen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Bcl-2-Expression nicht zu schnellerer Proliferation, sondern zu einer erhöhten Überlebensrate von Zellen führt (Cheng et al. 2004).

Das Tumorsuppressor Gen *p53* ist in den meisten menschlichen Tumoren mutiert bzw. deletiert. In gesunden Zellen kann p53 als Transkriptionsfaktor, je nach Schwere der DNA-Schädigung, Wachstumsstopp (Zellzyklusarrest durch p21, vgl. 1.2.2.3) oder Apoptose bewirken. Die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor ist wichtig für seine apoptoseinduzierende Funktion; so werden z.B. die Gene induziert, die am intrinsischen (Bax, Noxa, PUMA) und extrinsischen (CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2) Signalweg beteiligt sind. Post-translationale Modifizierungen, wie Phosphorylierung, Sumoylierung und Acetylierung verstärken zusätzlich die transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors. p53 induziert aber auch über transkriptionsunabhängige Mechanismen, wie Protein-Protein Interaktionen, mitochondriale Effekte und Relokalisierung der Todesrezeptoren an die Zelloberfläche, den Zelltod (Chipuk et al. 2004). In einem entsprechenden Mauslymphommodell konnte gezeigt werden, dass dabei nur die apoptosebeeinflussende Wirkung wichtig für seine Eigenschaft als Tumorsuppressor ist (Schmitt et al. 2002).

1.2 Zellzyklus und Apoptose

Die Gewebshomöostase ist von der richtigen Balance zwischen Zellwachstum und Zelltod abhängig. Das Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen bestimmt die Entscheidung über Leben und Tod der Zelle. Ein Ungleichgewicht führt zu Krankheiten infolge einer Hyperproliferation oder eines massiven Zellsterbens. Apoptose und Proliferation sind demnach eng verknüpft, was sich auch in ähnlichen morphologischen Veränderungen im Verlaufe der Apoptose und Mitose zeigt. In beiden Prozessen runden sich die Zellen ab, schrumpfen und ihr Chromatin kondensiert. Allerdings bestehen auch große Unterschiede, so fragmentieren apoptotische Zellen ihre DNA, während mitotische Zellen ihre verdoppelte DNA aufteilen. Die enge Verknüpfung von Zellwachstum und Zelltod zeigt sich u.a. darin, dass eine ganze Reihe von Proteinen an beiden Prozessen beteiligt sein können (Übersicht: Vermeulen et al. 2003), z.B.: c-Myc, p53, pRb, Ras, PKC, NF- κ B, CDK, Cycline und CKD-Inhibitoren; aber auch Bcl-2, IAPs, FADD, FLIP und Caspase-8.

1.2.1 Zellzyklusregulation

Jede sich teilende Zelle durchläuft einen Zellzyklus, in dem die Koordination von Zellwachstum, DNA-Synthese, Kern- und Zellteilung gewährleistet wird, und der zur Entstehung von zwei Tochterzellen führt. Pro Zyklus werden vier Phasen, die als G1-, S-, G2- und M-Phaseⁱ bezeichnet werden, durchlaufen (Abb. 1.8). Die zwei Hauptereignisse finden in der S-Phase mit der DNA-Synthese und während der Mitose mit der Verteilung der Chromosomen auf die zwei Tochterzellen statt. Die dazwischen liegenden Phasen werden als Lücken („gap“) bezeichnet, obwohl hier wichtige Prozesse ablaufen, die den Eintritt in die jeweils folgende Phase kontrollieren und regulieren. Somit wird sichergestellt, dass zuerst ein Prozess abgeschlossen wird, bevor der nächste beginnt, d.h. die Zellen z.B. erst dann in die Mitose eintreten, wenn ihre Chromosomen vollständig verdoppelt sind. Besteht z.B. ein Mangel an Wachstumsfaktoren, kann eine Zelle reversibel aus G1 in ein Ruhestadium (G0) übertreten.

Die Untersuchung der Zellzyklusregulation in Hefen als Modellsystem hat gezeigt, dass es wichtige Kontrollpunkte z.B. beim Übergang von der G1- in die S-Phase und von der G2- in die M-Phase gibt, die von spezifischen Kinasen reguliert werden (Zhou & Bartek 2004). Diese cyclinabhängigen Kinasen (CDKⁱⁱ) bestehen aus einer katalytischen Untereinheit (Kinase) im Komplex mit einem Cyclin

ⁱ G: Gap, S: Synthese, M: Mitose

ⁱⁱ CDK: Cyclin Dependent Kinase

(regulatorische Untereinheit). Dabei bestehen drei Ebenen der Regulierung: die Assoziation mit einem Cyclin, die Phosphorylierung im aktiven Zentrum der Kinase und die spezifische Inhibierung durch Komplexierung mit CDKIsⁱ (z.B. p21 und p27).

Das während der G2-Phase synthetisierte Cyclin B bildet beispielsweise am Übergang der G2- zur M-Phase einen Komplex mit der während des gesamten Zellzyklus exprimierten Kinase CDK1. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse führen zur Aktivierung der Kinaseaktivität des Komplexes. Zielproteine werden phosphoryliert und die Mitose beginnt. Im Anschluss daran wird Cyclin B wieder abgebaut, und der Komplex zerfällt (Murray 2004).

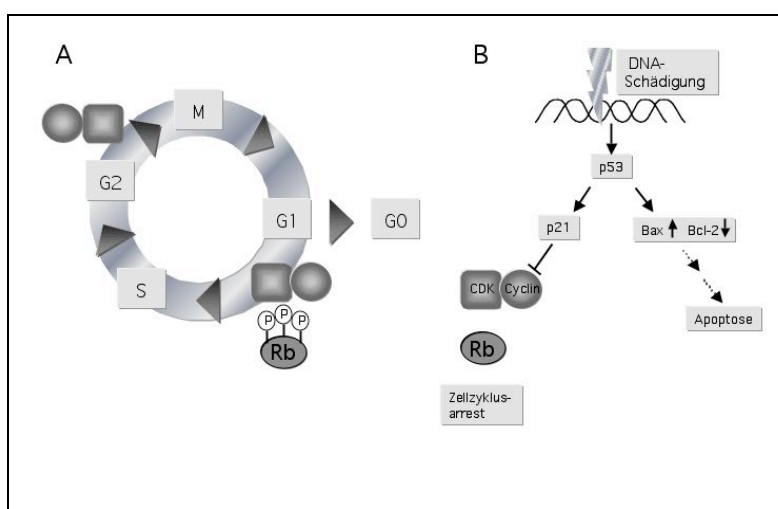


Abb. 1.8
Zellzyklusregulation

A: Pro Zyklus durchlaufen die Zellen die Phasen G1, S, G2 und M. Aktive CDK-Cyclin-Komplexe kontrollieren den Übergang von G1 zu S und G2 zu M. Dabei werden Zielproteine wie z.B. Rb phosphoryliert, was zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren führt, die dann die S-Phase einleiten. **B:** Dieser Vorgang wird kontrolliert. Eine DNA-Schädigung beispielsweise führt über p53 zur p21-Induktion, welches den CDK-Cyclin-Komplex hemmt. Somit bleibt die Zelle in der G1-Phase arretiert und die DNA-Neusynthese wird verhindert. Bei irreparabler Schädigung bedingen Veränderungen im Verhältnis der Bcl-2-Familienmitglieder die Apoptose der Zelle.

Die Cycline A und B üben jeweils im dimeren Komplex mit der CDK1-Kinase eine Funktion beim G2/M-Übergang aus. Cyclin A assoziiert zusätzlich mit der CDK2-Kinase, wobei dieser Komplex an der Regulation der S-Phasen-Progression beteiligt ist (Malumbres & Barbacid 2001). Die Cycline A und B werden am Ende der Mitose ubiquitinvermittelt abgebaut (Malumbres & Barbacid 2001).

Die Proteine der Cyclin D-Familie (Cyclin D1, D2 und D3) binden und aktivieren die Kinasen CDK4 und CDK6, während die E-Cycline (Cyclin E1 und E2) mit CDK2 interagieren und diese aktivieren. Die Expression von Cyclin E beginnt in der mittleren G1-Phase und erreicht ihr Maximum in der S-Phase (Malumbres & Barbacid 2001). Die Cycline D und E werden für den regulierten Übergang von G1 zu S benötigt (Abb. 1.9).

ⁱ CDKI: CDK-Inhibitor

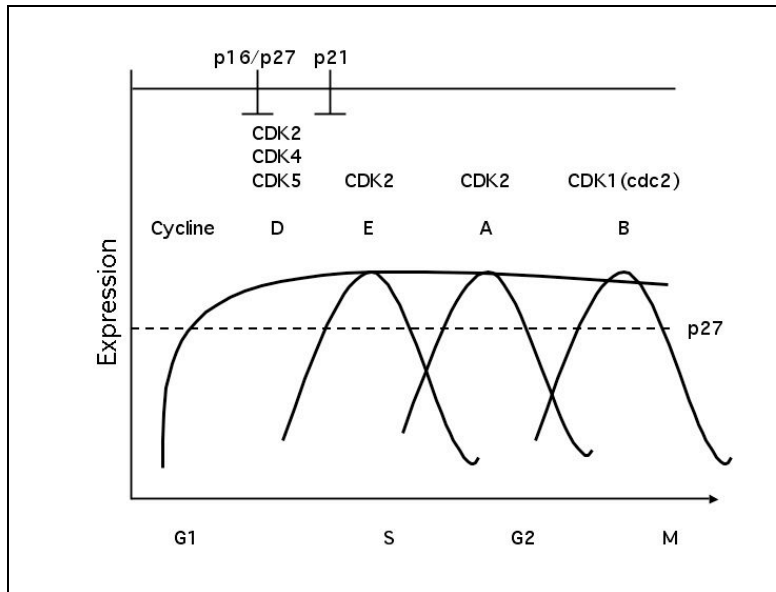


Abb. 1.9

Zellzyklusabhängige Expression der Cycline

Die D-Cycline bleiben im Verlauf des Zellzyklus relativ konstant. Die Cycline E, A und B werden zu den angegebenen Zeiten gebildet und später wieder abgebaut. Die Expression der CDKs und CDK-Inhibitoren bleibt konstant.

Quelle: Knippers, Molekulare Genetik, 8. Auflage 2001 (S.198)

1.2.2 Zellzyklus- und Apoptoseregulation humaner Zellen

In Säugerzellen sind Mitglieder der CDK-Familie an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, deren Expression im Gegensatz zu ihrer Aktivität zellzyklusunabhängig verläuft. Sie gewährleisten an den sog. Restriktionspunkten („check points“) den kontrollierten Übergang in die jeweils nächste Phase (Pines 1999, Zhou & Bartek 2004). So bedingt z.B. der CDK4/Cyclin D-Komplex die schrittweise Phosphorylierung des Rb-Proteins. Nach Überschreiten des Restriktionspunktes wird CDK2 durch das Cyclin E aktiviert, wonach pRb zusätzlich phosphoryliert wird und Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie (und DRTF1) freigesetzt werden. Diese bedingen daraufhin die Transkription der für die S-Phase benötigten Proteine. Infolge z.B. einer DNA-Schädigung wird dieser Prozess gestoppt, indem CDK-Inhibitoren die Aktivierung der CDK-Komplexe verhindern (Abb. 1.8; Stevens & La Thangue 2003).

Interessanterweise scheinen CDKs auch unterschiedliche Funktionen während der Apoptose auszuüben. Apoptoseinduzierende Substanzen (z.B. Taxol) verursachen die Aktivierung der CDK1- und CDK2-Kinasen vor dem Zelltod (Chadebech et al. 2000), während die Inhibierung von CDK1 die Zellen vor Apoptose protektioniert (Yu et al. 1998). CDK2 wird für die Apoptose von Thymozyten benötigt, eine Inhibierung der CDK2 schützt die Zellen vor Apoptose (Hakem et al. 1999).

Allerdings gibt es auch Studien, die eine apoptoseschützende Wirkung des aktiven CDK1-Cyclin B-Komplexes belegen: Beispielsweise schützen sich Tumorzellen gegen den Zelltod während der Mitose

durch die Expression des IAP-Familienmitglieds Survivin. Der CDK1/Cyclin B1-Komplex phosphoryliert Survivin, welches daraufhin den apoptotischen Zelltod hemmt (O'Connor et al. 2000). Eine erhöhte CDK1-Kinaseaktivität während der Mitose resultiert demnach in einer erhöhten Survivin-Expression und führt zum Überleben von Tumorzellen nach Taxol-Behandlung, während die Inhibierung der Kinaseaktivität in mitotisch arretierten Zellen die taxolinduzierte Apoptose verstärkt (O'Connor et al. 2002).

1.2.2.1 Regulierung der CDKs durch spezifische Inhibitoren (CDKI)

CDKIs werden in die INK4- und die Cip/Kip-Familie eingeteilt. Zur INK4-Familie gehören $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, $p18^{INK4c}$ und $p19^{INK4d}$. Diese Proteine binden an CDK4 und CDK6 und verhindern somit die Interaktion der Kinasen mit den zugehörigen G1-Phase-Cyclinen D1 bis D3. Zur Cip/Kip-Familie gehören $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$, welche an CDK/Cyclin-Komplexe binden und diese inaktivieren (Malumbres & Barbacid 2001). Die Aktivierung bzw. Expression von p21 erfolgt z.B. p53-abhängig als Antwort auf eine DNA-Schädigung und hat zur Folge, dass das Rb-Protein nicht phosphoryliert wird. Entsprechend werden die für die S-Phase benötigten Proteine nicht transkribiert und die Zellen arretieren in der G1-Phase (Stevens & La Thangue 2003). Durch Kontaktinhibition aktiviertes TGF β 1 blockiert den Übergang zwischen der G1- und S-Phase, indem p27 aktiviert wird, d.h. seine Expression durch die Aktivierung sog. Smad-Proteine erhöht wird (Moustakas et al. 2002, Zhang et al. 2002). p27 wiederum hemmt die Cyclin E/CDK2-Kinase, was zum Zellzyklusarrest führt. In proliferierenden Zellen dagegen liegt p27 an Cyclin D-CDK4/6- Komplexe assoziiert vor und ist dadurch inaktiviert. Dissoziiert p27 jedoch und bindet an CDK2, wird die Zellzyklusmaschinerie angehalten (Coqueret 2003). Dementsprechend besitzen ruhende (G0) Zellen oder differenzierte Zellen erhöhte Mengen an p27. Mitogene und extrazelluläre Matrixadhesionssignale führen zum Abbau von p27, und die ruhenden Zellen treten in den Zellzyklus ein und beginnen wieder zu proliferieren. Die Deletion des *p27* Gens hat eine Hyperplasie zur Folge, was sich in p27-Knockout-Mäusen zeigt, die 20-30% größer wachsen als Wildtypmäuse (Fero et al. 1996). CDKIs können indirekt (über CDKs) oder direkt an der Apoptoseregulation beteiligt sein. p27 spielt eine besondere Rolle in der Chemoresistenz, so hat sich gezeigt, dass Tumoren mit hohen Mengen an p27 zwar nur sehr langsam wachsen, aber auch kaum auf die Chemotherapie ansprechen. Niedrige p27-Spiegel sind ein Zeichen für schnell-wachsende, aggressive Tumore, die aber gut auf proliferationshemmende Chemotherapeutika ansprechen. p27 ist somit ein prognostischer Marker, dessen Status für die Art und Weise der Therapie berücksichtigt werden kann (Lloyd et al. 1999, St Croix et al. 1996).

1.2.2.2 c-Myc

Der Transkriptionsfaktor c-Myc stimuliert Zellzyklusprogression und Apoptose, wobei nicht klar ist, ob er generell beide Prozesse zusammen oder unabhängig voneinander auslöst (Zörnig & Evan 1996, Pelengaris et al. 2002). Die c-Myc-Aktivität wird posttranslational durch Phosphorylierung und Interaktion mit zellulären Proteinen (z.B. Max) reguliert (Vermeulen et al. 2003). c-Myc initiiert den G0 → S Übergang, indem es auf mitogene Signale reagiert und die Zellen durch die Transkription von zellzyklusrelevanten Genen in die G1-Phase des Zellzyklus treibt. c-Myc beeinflusst die Transkription von *Cdc25A*, *Cyclin D1*, *Cyclin D2*, *Cyclin E*, *Cyclin A*, *CDK1*, *CDK2*, *CDK4* und *E2F*, aber auch *Gadd45*, *Gadd153*, *p15*, *p21* und *p27* (Vermeulen et al. 2003). Die c-Myc induzierte Apoptose ist von der CD95L und CD95 Expression abhängig, führt zur Cytochrom c Freisetzung und ist durch Bcl-2 inhibierbar (Hueber et al. 1997).

1.2.2.3 p53, pRB und E2F

p53 induziert Zellzyklusarrest und Apoptose. Es reguliert diese Prozesse zum einen durch die Transaktivierung entsprechender Gene, aktiviert die Apoptose aber auch transkriptionsunabhängig (Vermeulen et al. 2003). Der Tumorsuppressor pRB ist wegen der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie E2F für einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase verantwortlich. Nach pRb-Phosphorylierung durch CDK/Cyclin-Komplexe wird E2F freigesetzt und somit die Proliferation der Zelle stimuliert (Stevens & La Thangue 2003). Allerdings ist pRb auch in der Lage, apoptotische Prozesse zu hemmen. So zeigen Rb-defiziente Embryos nicht nur zellzyklusbedingte Defekte in verschiedenen Geweben (Augenlinse, Muskeln, ZNS), sondern auch massive Apoptose in diesen Geweben (Chau & Wang 2003). E2F induziert die Expression zellzyklusrelevanter Gene, die für die S-Phase benötigt werden, aber auch die Transkription des apoptosefördernden Moleküls Apaf-1 (Moroni et al. 2001). Allerdings kann E2F keine Apoptose induzieren, wenn pRb koexprimiert wird, da dieses die Apoptose wiederum durch die Hemmung von E2F hemmt (Vermeulen et al. 2003). Freies E2F induziert die p53 Transkription und verbindet damit den pRb/E2F Signalweg mit der p53-abhängigen Apoptose (Vermeulen et al. 2003).

1.2.2.4 RAS

Ras ist ein membrangebundenes G-Protein. Wird es aktiviert, löst es über die Raf-Kinase eine Phosphorylierungskaskade, die MAPKⁱ-Signalkaskade, aber auch über direkte Bindung an die p110-Untereinheit der PI3K den PI3K-Signalweg, aus. Somit spielt Ras eine Rolle in der Zellproliferation (MAPK/ERK Signalweg) und der Apoptose (PI3K/Akt; Downward 2003).

1.2.2.5 Bcl-2

Das anti-apoptotische Bcl-2 ist nicht nur an der Apoptoseregulation beteiligt, sondern kann auch die G1-Phase verlängern, unter bestimmten Bedingungen den Austritt aus dem Zellzyklus in die G0-Phase herbeiführen und zudem den Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus verzögern (Vairo et al. 2000, Kirkin et al. 2004). Zudem wird Bcl-2 zellzyklusabhängig während der Mitose phosphoryliert (Furukawa et al. 2000) und damit inaktiviert (Yamamoto et al. 1999).

1.2.2.6 NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert neben Proteinen, die eine Rolle in Entzündungsreaktionen (Zytokine, Chemokine), Wachstum (Cyclin D, c-Myc) und Differenzierung spielen, auch anti-apoptotische Proteine wie z.B.: Bcl-2, Bcl-x_L, Bfl-1/A1 und IAPs (Karin et al. 2002). Allerdings kann es unter bestimmten Bedingungen auch zur Transkription pro-apoptotischer Gene, z.B. CD95L, kommen (Kuhnel et al. 2000). In nicht-stimulierten Zellen liegt NF- κ B inaktiviert an I κ B gebunden im Zytosol vor (Karin et al. 2002).

1.2.2.7 IAPs – Survivin

Survivin, ein Mitglied der IAP-Familie, wird zellzyklusabhängig exprimiert und ist an verschiedenen Komponenten des mitotischen Apparates lokalisiert (Giodini et al. 2002). Survivin hemmt nicht nur die Apoptose, sondern reguliert auch den Aufbau der Mitosespindel aus Mikrotubuli (Li et al. 1998, Reed & Bischoff 2000). Wichtig für seine Funktion ist dabei die Phosphorylierung an Thr 34 (O'Connor et al. 2002) durch den CDK1/Cyclin B1-Komplex. Wird dieses Threonin gegen ein Alanin ausgetauscht, ist keine Phosphorylierung dieser Position möglich, was in der Apoptose einer Vielzahl von Tumorzellen resultiert (O'Connor et al. 2000, Wall et al. 2003) und das Tumorstadium *in vivo* verhindert (Grossman et al. 2001).

ⁱ MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

1.2.2.8 Die Rolle der Todesrezeptoren in der Proliferation

CD95 besitzt außer seiner Funktion in der Apoptose auch eine Bedeutung in der Lymphozytenproliferation (Budd 2002; Abb. 1.10). Eine funktionelle Inaktivierung von FADD durch eine dominant-negative Deletionsmutante (FADD-DN; Newton et al. 1998, Walsh et al. 1998, Zörnig et al. 1998) oder Deletion des FADD Gens (Zhang et al. 1998) führen zur defekten T- und B-Zellproliferation in Mäusen. Vermutlich wird der Rezeptor aktiviert und das Signal über FADD übertragen. Dies führt zur Aktivierung der NF- κ B- und Erk-Signalwege (Hu et al. 2000).

Eine weitere Verbindung zur Zellzyklusregulation zeigt sich darin, dass FADD während der G2/M-Phase phosphoryliert (Scaffidi et al. 2000) und im weiteren Verlauf wieder dephosphoryliert wird (Hua et al. 2003). Eine Verbindung zur Proliferation konnte auch für Caspase-8 (Salmena et al. 2003) und Caspase-3 (Woo et al. 2003) bestimmt werden:

Caspase-8 wird für die Proliferation reifer T-Zellen, aber nicht für die T-Zellreifung im Thymus benötigt. Mäuse mit einer T-zellspezifischen Defizienz an Caspase-8 entwickeln als Antwort auf eine Infektion, keine reifen zytotoxischen T-Zellen (Salmena et al. 2003).

Caspase-3 ist an der Regulation der Proliferation von B-Zellen beteiligt. Caspase-3-defiziente Zellen sind hyperproliferativ, was allerdings nicht aus der Hemmung der Apoptose, sondern aus einer erhöhten Zellzyklusaktivität resultiert (Woo et al. 2003).

FLIP_L-transgene Mäuse zeigen vermutlich aufgrund der verminderten Caspase-8-Aktivität eine reduzierte Proliferation (Tai et al. 2004).

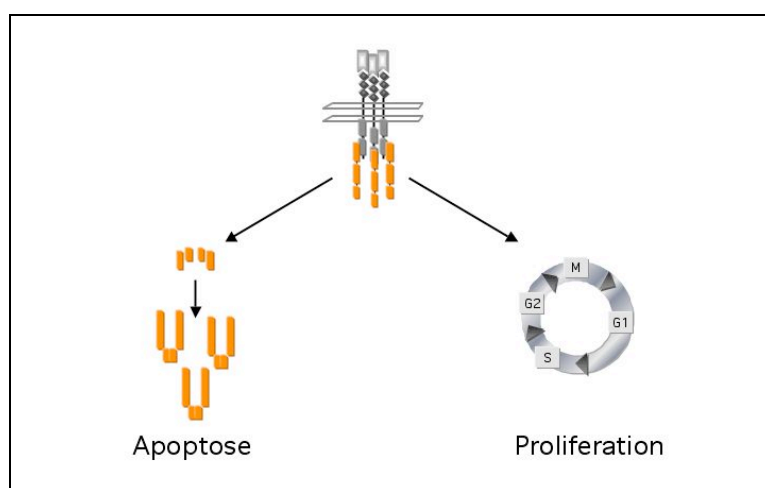


Abb. 1.10

Todesrezeptoren regulieren Apoptose und Proliferation

CD95 besitzt über seine Signalmoleküle FADD und Caspase-8 neben seiner Funktion in der Apoptose auch eine Bedeutung in der Zellproliferation.

1.3 Tumormigration, Angiogenese und Metastasierung

Die Zellmigration ist ein komplexes Ereignis, das unter physiologischen Umständen u.a. an der embryonalen Morphogenese und der Wundheilung beteiligt ist, aber auch bei Krankheiten wie Krebs eine Rolle spielt. Stark entdifferenzierte Tumore erlangen in der Regel die Fähigkeit zur Metastasierung. Dazu müssen sich die Tumorzellen aus ihrem Zellverband lösen und in Blutgefäße eindringen, um sie an entfernter Stelle wieder zu verlassen und in anderen Organen Metastasen zu bilden. Das erfordert einerseits die Fähigkeit zur Migration und andererseits den Abbau von Gewebescheiden, was durch die Ausschüttung von proteolytischen Enzymen oder durch die Unterdrückung der Expression oder Aktivität von Proteasehemmern erzielt wird. Um die Blutbahn wieder verlassen zu können, binden die migrierenden Tumorzellen an spezifische Adhäsionsmoleküle des Endothels und durchdringen die Gefäßwand (Friedl & Wolf 2003).

1.3.1 Zell-Zell-Kontakt durch Integrine und Cadherine

Die Familie der Integrine besteht aus Oberflächenrezeptoren, welche an Zell-Zell-Interaktionen und an der Adhäsion mit EZMⁱ-Glycoproteinen beteiligt sind. Jeder Rezeptor dieser Familie ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Dabei ist jede Untereinheit ein integrales TypI-Transmembranprotein, bestehend aus drei Domänen: der glykosylierten extrazellulären Domäne, der hydrophoben Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne. Integrine binden Liganden der EZM, z.B. Collagen, Laminin, Fibronectin, ICAM 1-3, Fibrinogen und Thrombospondin (Giancotti & Ruaslahti 1999). Integrine spielen eine Rolle in der Embryogenese, Zelldifferenzierung und Proliferation (Yamada & Even-Ram 2002). Die Interaktion der Integrine mit Matrixproteinen führt auch zur intrazellulären Signalübertragung, denn es werden sog. „focal adhesions“, bestehend aus Matrixproteinen auf der extrazellulären Seite und Microfilamenten im Komplex mit aktinbindenden Proteinen auf der zytoplasmatischen Seite gebildet (Hanks et al. 2003). Ferner kommt es zur Bindung von Adaptorproteinen, Phosphokinasen und Chaperonen. Folgende Kinasen können dabei aktiviert werden: FAKⁱⁱ, PKC, PAKⁱⁱⁱ, PI3K und ILK^{iv} (Geiger et al. 2001). Die Aktivierung der FAK führt zum einen über Ras zur Aktivierung des MAPK-Signalweges (Raf→MEKK→Erk; Schaller 2001), zum anderen über Cdc42 und Rac zu Migrationsprozessen, wobei ein mangelndes Signal (Integrin nicht an EZM gebunden) zur Migration führt (Ridley 2001). So können ganz unterschiedliche Prozesse wie

ⁱ EZM: Extrazelluläre Matrix

ⁱⁱ FAK: Focal Adhesion Kinase

ⁱⁱⁱ PAK: p21-Activating Kinase

^{iv} ILK: Integrin-linked kinase

Differenzierung, Proliferation und Apoptose aktiviert oder inhibiert werden. Das Überleben einer Endothelzelle hängt von der Zell-EZM Interaktion ab. Bleibt das Signal über die Integrine aus, kommt es zur Apoptose (Anoikis; Frisch & Sreaton 2001).

Neben Integrinen sind auch Cadherine an Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Cadherine sind integrale Membranglycoproteine mit einer Transmembran- und einer intrazellulären Domäne, die als Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsmoleküle agieren (Hirohashi & Kanai 2003). Der wichtigste Vertreter dieser Familie ist das E-Cadherin, dessen extrazelluläre Domäne aus fünf Unterdomänen (EC1-EC5) besteht. Ein E-Cadherin bindet dabei selektiv an ein E-Cadherin einer zweiten Zelle. Im Zytoplasma interagiert E-Cadherin mit Cateninen, wie z.B. dem β -Catenin. Dieser Komplex wird zur Stabilisierung über ein α -Catenin mit Aktinfilamenten verbunden. Eine Unterdrückung der E-Cadherin-Aktivität führt zur Freisetzung der Tumorzellen vom Primärtumor, weshalb E-Cadherin als prognostischer Marker dient: Differenzierte, adhesive Tumorzellen exprimieren vermehrt E-Cadherin, während undifferenzierte Tumorzellen, welche den Zell-Zell-Kontakt verloren haben und invasive Eigenschaften zeigen, nur sehr niedrige Mengen an E-Cadherin besitzen, was mit einer schlechten Prognose einhergeht (Vleminckx et al. 1991, Shimoyama & Hirohashi 1991, Bringuier et al. 1993). In diesen Tumorzellen ist die E-Cadherin-Expression gehemmt, weil der Promotor des Gens hypermethyliert wird oder, in seltenen Fällen, das Gen mutiert vorliegt (Yoshiura et al. 1995, Hirohashi & Kanai 2003). Jedoch wird z.B. in Kolorektaltumoren erst das exprimierte Protein posttranslational durch die Interaktion mit Dysadherin gehemmt (Ino et al. 2002).

Die Bindung von β -Catenin an das Cadherin wird zusätzlich von Wnt-1 stabilisiert (Hinck et al. 1994). β -Catenin wird durch Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. ErbB2 nach Aktivierung durch EGF, phosphoryliert. Dies erhöht die invasiven Eigenschaften der Zellen, denn wird die Tyrosinkinase inhibiert, erhöht dies die Adhärenz der Zellen (Shibata et al. 1996).

1.3.2 Rho-GTPasen beeinflussen Morphologie und Migration der Zellen durch Interaktionen mit dem Zytoskelett

Grundsätzlich funktionieren Rho-GTPasen durch einen Wechsel zwischen zwei Konformationsstadien: GTP gebunden (aktiv) und GDP gebunden (inaktiv), wobei GEFsⁱ den Nukleotidaustausch katalysieren. Die Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 regulieren unterschiedliche Signaltransduktionswege und verknüpfen somit Plasmamembranrezeptoren mit dem Aktinzytoskelett. Die

ⁱ GEF: Guaninnucleotide Exchange Factor

GTPasen sind an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, z.B. Zellpolarität, G1-Zellzyklusprogression, vesikulärer Transport, Phagozytose, Sekretion und Migration (Etienne-Manneville & Hall 2002).

Rho, Rac und Cdc42 beeinflussen unterschiedliche Prozesse innerhalb der G1-Phase des Zellzyklus. Rho wird z.B. benötigt, um die Expression von p21 zu verhindern (Olson et al. 1998), Rac und Rho dagegen fördern die Transkription von Cyclin D (Welsh et al. 2001). Zusätzlich sind Rho und Cdc42 an der Zytokinese beteiligt (Glotzer 2001). Während der Phagozytose induzieren Cdc42 und Rac die Aktinpolymerisierung, um Membranerweiterungen zu formieren, deren Aufgabe es ist, die zu phagozytierenden Partikel zu umhüllen (Caron & Hall 1998). Zur Einleitung der Migration induziert Rac die Aktinpolymerisierung und Bildung eines Integrinadhensionkomplexes an der Zellperipherie. Dies führt zur Membranerweiterung und ist essentiell für die Migration von Zellen. Cdc42 dirigiert und stabilisiert dabei die Rac-Aktivität an der Migrationsfront. Die Anheftung an die EZM oder an angrenzende Zellen dient dabei als Zugmaschine, mit der sich die Zellen über die Anheftung hinweg ziehen (Ridley et al. 2003).

Rho-GTPasen können je nach Zellumgebung sowohl an der Apoptosestimulation über die Aktivierung des JNK-Signalweg, als auch an der Apoptosehemmung durch die PI3K-abhängige Aktivierung der anti-apoptotischen Akt-Kinase beteiligt sein (Murga et al. 2002). Des Weiteren verhindert aktives Cdc42 ebenfalls über einen PI3K-vermittelten Signalweg die durch Kontaktverlust induzierte Apoptose (Anoikis; Cheng et al. 2004).

Auch das Aktinzytoskelett spielt eine Rolle in der Apoptoseregulation, denn DISC-Bildung sowie Rezeptorendozytose sind aktinabhängig (Algeciras-Schimmich et al. 2002). Die aktinabhängige CD95-Aktivierung ist spezifisch für TypI-Zellen (Algeciras-Schimmich & Peter 2003), denn ein Inhibitor der Aktinpolymerisierung hemmt die DISC-Bildung und damit die Apoptose in TypI-Zellen. TypII-Zellen reagieren hingegen auf microtubuliinteragierende Substanzen sensibel (Algeciras-Schimmich et al. 2003).

1.3.3 Tumorangiogenese

Die Größenzunahme eines Tumors erfordert die entsprechende Kapillarisation zur Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen (Bergers & Benjamin 2003). Die Angiogenese wird durch Freisetzung von Mediatoren (z.B. Angiogenin, IL-8, NO) stimuliert und kann durch Angiogenese-Hemmer (Angiostatin, Endostatin) unterbunden werden. Angiogenin und IL-8 werden z.B. von malignen Melanomen korrelierend mit dem Metastasierungsgrad der Tumoren exprimiert. Die Expression von

angiogenesefördernden Faktoren (z.B. VEGF) wird durch das Onkogen Ras unterstützt (Kranenburg et al. 2004).

IL-8 (CXCL8) wurde in der Funktion eines Neutrophilenaktivierungsfaktors als erstes Chemokin identifiziert. IL-8 ist ein Chemokin der C-X-C-Familie und wird von einer Vielzahl von Zellen, wie etwa Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Ebenso werden die IL-8 Rezeptoren auf zahlreichen Zellen exprimiert. Es bindet an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. Inzwischen sind 18 unterschiedliche Chemokin-Rezeptoren und 30 unterschiedliche Chemokine bekannt. Sie aktivieren durch ihre Bindung an den zugehörigen Rezeptor die PLC und die PI3K, was wiederum zur Aktivierung des PKC- und Akt-Signalweges führt (Thelen 2001). Zusätzlich können noch weitere Signalwege über die Kinasen Pyk-2, MAPK und FAK aktiviert werden. IL-8 stimuliert die Proliferation und Migration von Kolonepithelzellen (Wilson et al. 1999) und dient als Lockstoff für phagozytierende Zellen (Weiner & Maizels 1999).

In Endothelzellen hemmt IL-8 die Apoptose, indem es die Genexpression anti-apoptotisch wirkender Moleküle erhöht (Bcl-x_L, Bcl-2; Li et al. 2003). Zusätzlich erhöht IL-8 in diesen Zellen die MMP-2- und MMP-9-Expression und Produktion (Li et al. 2003). IL-8 blockiert in einer Ovarientumorzelllinie die TRAIL-induzierte Apoptose über die Aktivierung des MAPK-Signalweges (Abdollahi et al. 2003).

Angiogenin ist ein 14 kDa Polypeptid der pankreatischen RNase-Superfamilie, das ursprünglich aus konditioniertem HT29ⁱ-Zellkulturüberstand isoliert wurde und welches die Neovaskularisierung (Angiogenese) induziert (Fett et al. 1985, Shapiro et al. 1986), indem es an spezifische Rezeptoren auf Endothelzellen bindet (Hatzl & Badet 1999).

Tumorzellkulturen sekretieren *in vitro* Angiogenin in ihr Medium, wobei die Sekretion während der exponentiellen Wachstumsphase ansteigt und kurz vor Dichtwachsen der Kultur ein Plateau erreicht (Moenner et al. 1994). Angiogenin bindet an Aktin, und dieser Aktin-Angiogenin-Komplex beschleunigt die Generierung von Plasmin durch tPAⁱⁱ. Plasmin degradiert daraufhin Laminin- und Fibronektinkomponenten der Basalmembran (Hu & Riordan 1993), was die Migration der Zellen erleichtert.

NO ist ein von NO-Synthasen produzierter „second messenger“, der in einer Vielzahl biologischer Prozesse involviert ist (Moncada & Erusalimsky 2002). Die Überexpression der durch Zytokine

ⁱ HT29: Kolonkarzinom-Zellen

ⁱⁱ tPA: tissue Plasminogen Activator

induzierbaren Isoform der NO-Synthase (iNOSⁱ) wird in vielen humanen Kolontumorzellen beobachtet, in denen sie an der Tumorentwicklung beteiligt ist (Ambs et al. 1998). NO führt zur Angiogenese der Tumorzellen und ist auch an Migrationsprozessen beteiligt. So sind z.B. Lungenmetastasen stark eNOSⁱⁱ positiv, was vermuten lässt, dass die eNOS-Expression Metastasierung unterstützt. Eine Hemmung der Synthase supprimiert Angiogenese, Migration und Invasivität (Jadeski et al. 2000). eNOS-Aktivität wird z.B. durch die Akt-Kinase reguliert (Fulton et al. 1999), und NO kann zur Aktivierung von Ras führen (Lander et al. 1995). NO kann, abhängig von Konzentration, Zelltyp und oxidativem Milieu, Apoptose inhibieren oder auslösen. Es bewirkt die S-Nitrosylierung der Caspasen (Li et al. 1997), was nicht nur die Apoptose inhibiert, sondern auch die caspasevermittelte T-Lymphozytenproliferation (Mahidhara et al. 2003). Im Gegensatz dazu ist das Signalmolekül jedoch auch in der Lage, indirekt die Caspasen zu aktivieren, indem caspaseinhibierende Proteine (IAPs) inaktiviert werden, und damit Apoptose auszulösen (Stanford et al. 2001, Mannick et al. 1999).

Das Onkogen Ras unterstützt die Expression angiogenesestimulierender Wachstumsfaktoren, denn Tumoren mit mutiertem konstitutiv aktivem Ras zeigen hohe Spiegel an VEGFⁱⁱⁱ, einem der potentesten angiogenesestimulierenden Wachstumsfaktoren (Kranenburg et al. 2004). Zwei Ras-aktivierte Signalwege sind an der Kontrolle der VEGF-Expression beteiligt: Der Ras→Raf→MEK→ERK1/2 Signalweg (Milanini et al. 1998) und der Ras→PI3K→PDK→PKB/Akt Signalweg (Kranenburg et al. 2004). Hypoxia (Sauerstoffmangel) oder Azidose (pH-Wert Abfall) können an der Auslösung der VEGF-Expression beteiligt sein (Kranenburg et al. 2004). Ras unterstützt des Weiteren die Migrationsfähigkeit einer Tumorzelle, indem es die Thrombospondin (TSP)-Expression unterdrückt. TSP-1 und TSP-2 sind extrazelluläre Matrixglycoproteine, die Angiogenese, Migration und Zellviabilität negativ beeinflussen, indem sie Apoptose induzieren (Lawler 2002, Adams et al. 2001, Friedl et al. 2002). Zusätzlich stimuliert aktiviertes Ras die Expression verschiedener Proteasen, welche die EZM^{iv} abbauen (vgl. 1.3.4) und somit Migration und Invasion erleichtern (Sottile 2004).

ⁱ iNOS: inducible NO-Synthase

ⁱⁱ eNOS: endothelial NO-Synthase

ⁱⁱⁱ VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

^{iv} EZM: Extrazelluläre Matrix

1.3.4 Proteolytische Prozessierung von EZM-Molekülen

An der proteolytischen Prozessierung der EZM-Moleküle sind uPAⁱ und MMPsⁱⁱ (MMP-2 und MMP-9) beteiligt (Friedl & Wolf 2003). uPA kontrolliert die Umwandlung des inaktiven Zymogens Plasminogen in die aktive Protease Plasmin, welche daraufhin Komponenten der EZM und der Basalmembran degradiert. Plasmin aktiviert wiederum Metalloproteasen, was zum weiteren Abbau der EZM führt. Der uPA-Rezeptor (uPAR) dient der Lokalisierung der Plasminbildung an der Zelloberfläche und unterstützt damit die Tumorzellmigration durch die EZM und die Basalmembran. uPA aktiviert über den uPAR zusätzlich intrazelluläre Signalwege, was zur Stimulation von Proliferation und Migration führt (Blasi & Carmeliet 2002). Die Degradierung der EZM durch MMPs oder Plasmin kann jedoch auch die Angiogenese fördern, indem an die Matrix gebundene angiogenetische Faktoren wie z.B. FGF-2 und VEGF freigesetzt werden (Kranenburg et al. 2004). Allerdings können die Proteasen die Angiogenese auch hemmen, da sie Fragmente von Matrixmolekülen generieren (z.B. Endostatin, ein Collagen XVIII-Fragment), welche angiogeneseinhibierende Eigenschaften besitzen (Sottile 2004.).

MMPs sind zinkabhängige Endopeptidasen mit der Aufgabe, Proteine zu degradieren. Sie regulieren damit viele Zelleigenschaften, die u.a. eine Bedeutung für die Tumorzellproliferation, -differenzierung, -apoptose, -migration, -invasion und -angiogenese haben (Egeblad & Werb 2002). Die Einteilung der über 21 humanen MMPs erfolgt nach ihrer Struktur in 8 Gruppen, wovon fünf aus sekretierten und drei aus membrangebundenen MMPs bestehen. Die sekretierten Proteinase können u.a. an Integrine, CD44, Heparansulphatproteoglycane oder Collagen Typ IV binden (Brooks et al. 1996, Yu et al. 2002). Die Proteinase werden als inaktive Zymogene synthetisiert und außerhalb der Zelle von aktiven MMPs oder anderen Serin-Proteasen aktiviert, indem die Prodomäne proteolytisch entfernt wird (Egeblad & Werb 2002.). So sind an der MMP-2-Aktivierung MMP-14 und TIMP-2ⁱⁱⁱ beteiligt. TIMP-2 bindet an MMP-14 und Pro-MMP-2. Dadurch kann MMP-14 die Prodomäne von MMP-2 mit Unterstützung bereits aktiver MMP-2 abspalten und Pro-MMP-2 somit aktivieren (Morrison et al. 2001). Endogene Inhibitoren der MMP-Aktivität sind z.B. α 2-Macroglobulin und TSP-2 (Yang et al. 2001). MMP-Substrate sind Strukturkomponenten der EZM, deren Proteolyse die Migration erleichtert (Streuli 1999). MMPs und die mit ihnen verwandten Mitglieder der ADAMs^{iv}-Familie sind auch an der Freisetzung einiger zellmembrangebundener Wachstumsfaktoren sowie Wachstumsfaktorrezeptoren (FGF-R1, c-Met, ErbB2) beteiligt (Egeblad & Werb 2002). Dabei werden die extrazellulären Domänen

ⁱ uPA: urokinase Plasminogen Activator

ⁱⁱ MMP: Matrixmetalloproteinase

ⁱⁱⁱ TIMP-2: Tissue Inhibitor of MMP-2

^{iv} ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase

der Rezeptoren freigesetzt, welche wiederum als „Decoy Rezeptoren“ die Liganden abfangen können und somit die Signalübertragung hemmen (Egeblad & Werb 2002). Weitere MMP-Substrate sind z.B. Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin (Noe et al. 2001) und CD44 (Kajita et al. 2001), was zu einer erhöhten Invasivität führt. Über die Spaltung von Integrinen verstärken MMPs die Zellmigration. MMP-9 spaltet Chemokine wie z.B. IL-8, was die IL-8-Aktivität um das 10-fache erhöht (Egeblad & Werb 2002). Die Rolle der MMPs in der Apoptose kann sehr unterschiedlich sein. So unterstützt MMP-3, wenn es in Epithelzellen überexprimiert wird, die Apoptose durch die Proteolyse von Laminin (Sympson et al. 1994). MMP-7 dagegen setzt membrangebundenen CD95L frei, was zur Apoptose von Nachbarzellen führt (Mitsiades et al. 2001). Darüber hinaus inhibiert MMP-7 die Apoptose, indem es membrangebundenes HB-EGFⁱ freisetzt (Yu et al. 2002). Dieses bindet und aktiviert ErbB4, ein Rezeptor, der den anti-apoptotischen PI3K-Akt-Signalweg aktiviert (Kainulainen et al. 2000, Mahtouk et al. 2004). MMP-11 unterstützt das Überleben von Tumorzellen, indem es den „survival-factor“ IGFⁱⁱ freisetzt (Manes et al. 1997, Egeblad & Werb 2002).

In Abbildung 1.11 sind die Prozesse, die zu Tumorangiogenese, Migration und Metastasierung führen, zusammengefasst dargestellt.

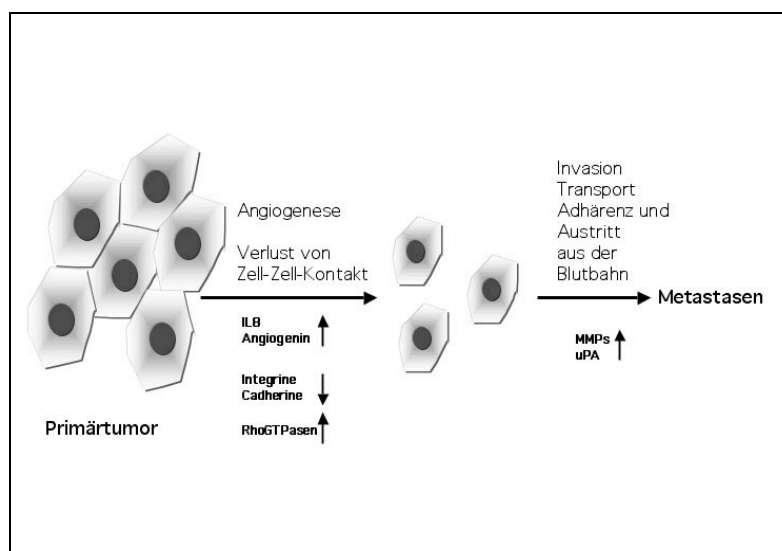


Abb. 1.11

Metastasierung

Erreicht ein Primärtumor eine gewisse Größe, braucht er zur ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung Anschluss an das Gefäßsystem. Dies wird durch vom Tumor sezernierte angiogenetische Faktoren gefördert. Zur Invasion in Lymphgefäße, Venolen oder Kapillaren müssen die Tumorzellen die Basalmembran durchdringen. Es folgt der Transport der Tumorzellen durch die Blutgefäße, bis die Zellen im Kapillarbett stecken bleiben. Hier treten sie wieder aus der Blutbahn heraus und siedeln sich im neuen Gewebe an (Metastasen). Dabei werden u.a. die Aktivitäten von Integrinen, Cadherinen, Rho-GTPasen, VEGF, IL-8, Angiogenin, MMPs und uPA beeinflusst bzw. benötigt.

ⁱ HB-EGF: Heparin-Binding-Epidermal Growth Factor

ⁱⁱ IGF: Insulin-Like Growth Factor

1.4 Ziel der Arbeit

Mitotische und apoptotische Zellen besitzen viele Gemeinsamkeiten. Sie ähneln sich nicht nur in ihrer Morphologie, sondern es sind auch viele der beteiligten Moleküle in beiden Prozessen involviert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dabei untersucht werden, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der Zellzyklus- und Apoptoseregulation in der todesrezeptorvermittelten Apoptose in RKO-Zellen gibt. Es sollten molekulare Erklärungen dafür gefunden werden, dass langsam wachsende Tumoren schlechter auf apoptoseauslösende Therapien ansprechen als schnell wachsende.

Die verwendeten kolorektalen Tumorzellen (RKO) sind schnellproliferierend (gering differenziert) und besitzen Wildtyp-p53. In mehreren Ansätzen wurde untersucht, welcher Zusammenhang in diesen Zellen zwischen Zellzyklus und Antwort auf einen Apoptosestimulus besteht.

Zum einen sollte durch die induzierbare Expression bzw. transiente Transfektion der CDK-Inhibitoren p21 und p27 ein G1-Arrest bewirkt und daraufhin das Apoptoseverhalten der p21- bzw. p27-überexprimierenden Zellen analysiert werden.

Zum anderen sollten die Zellen mithilfe diverser arrestauslösender Substanzen bzw. durch Serumentzug synchronisiert werden, um dann das Apoptoseverhalten dieser Zellpopulation im Arrest, aber auch nach synchronem Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus untersuchen zu können.

Zusätzlich wurde die CD95-vermittelte Apoptose in nicht arretierten, proliferierenden Tumorzellen charakterisiert. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob RKO-Zellen aus einer bestimmten Zellzyklusphase heraus bevorzugt sterben. Dies sollte anhand der simultanen Messung der Zellzyklusverteilung und bestimmter Apoptosemarker erfasst werden.

Schließlich wurde in einem weiteren Ansatz die Apoptose in dichtearretierten Zellen untersucht, die sich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befinden. Dabei sollte auch das konditionierte Medium der dichtearretierten Zellen auf seinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Lieferant
A crylamid (Rotiphorese Gel)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Akt Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
Angiogenin	Sigma, Taufkirchen
Aphidicolin	Calbiochem, Bad Soden
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth, Karlsruhe
B orat	Roth, Karlsruhe
BrdU	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA (bovines Serumalbumin)	PAA, Linz, Österreich
C alciumchlorid	Merck, Darmstadt
hCD95L	Alexis, Grünberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliantblau	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma, Taufkirchen
D aidzein	Sigma, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Digitonin	Sigma, Taufkirchen
DMEM	BioWhittaker, Belgien
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen
DNase I, RNase frei	Roche, Mannheim
DNA Größenmarker (1kb)	Gibco, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
E CL	Amersham, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
F KS (Fetales Kälberserum)	Gibco, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
G 418	Calbiochem, Bad Soden
Genistein	Calbiochem, Bad Soden
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	BioWhittaker, Belgien

Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerophosphat	Roth, Karlsruhe
Gö 6976	Calbiochem, Bad Soden
GS-E	Invitrogen, Karlsruhe
H ₂ O Bidest	Milli-Q gereinigt und autoklaviert
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hygromycin	Calbiochem, Bad Soden
I L8	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
K aliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma, Taufkirchen
L B Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe
L-NAME	Sigma, Taufkirchen
Ly294002	Calbiochem, Bad Soden
M agnesiumsulfat	Fluka, Buchs, Schweiz
MEMalpha	Gibco, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	AppliChem, Darmstadt
Mimosin	Sigma, Taufkirchen
MMP Inhibitor II	Calbiochem, Bad Soden
Muristeron A	Invitrogen, Karlsruhe
N atriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Natriumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	AppliChem, Darmstadt
Nocodazol	Sigma, Taufkirchen
O ncostatin M (OSM)	Sigma, Taufkirchen
P BS	BioWhittaker, Belgien
Penicillin/Streptomycin	BioWhittaker, Belgien
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
PMA (Phorbolmeytylacetat)	Calbiochem, Bad Soden
PMSF	Roth, Karlsruhe

Polybren	Sigma, Taufkirchen
Protein A	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Roche, Mannheim
PolyHema (Poly2-Hydroxyethyl Methacrylat)	Sigma, Taufkirchen
Ponasteron A	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceaurot	Fluka, Buchs, Schweiz
Protease Inhibitor Mix (Complete)	Roche, Mannheim
Protein A Sepharose CL4B	Sigma, Taufkirchen
Proteingrößenstandard	GibcoBRL, Karlsruhe
Puromycin	Calbiochem, Bad Soden
R NaseA	Roche, Mannheim
Rapamycin	Calbiochem, Bad Soden
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
S aponin	Sigma, Taufkirchen
SNP	Sigma, Taufkirchen
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
Sucrose	Sigma, Taufkirchen
T EMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
TRAIL (Killer-TRAIL)	Alexis, Grünberg
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton-X 100	Roth, Karlsruhe
Triazol	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
W ortmannin	Calbiochem, Bad Soden
X ylencyanol	Roth, Karlsruhe
Z eocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Material für die Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Zelllinie	Erhalten von
293T	AG Grez, GSH, Frankfurt a.M.
CHO	ATCC CCL-61
HeLa	ATCC CCL-2
NIH 3T3	ATCC CRL-1658
RKO	ATCC CRL-2577
RKOp21, RKOp27	Dr. M. Schmidt, Asta Medica, Frankfurt

2.2.2 Kulturmedium für RKO-, HeLa- und NIH 3T3-Zellen

Material	Menge
DMEM	500 ml

FKS	10% (v/v)
Glutamin	10 ml (200 mM)
100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin	5 ml

2.2.3 Kulturmedium für CHO-Zellen

Material	Menge
MEM-α	500 ml
FKS	10 % (v/v)
Glutamin	10 ml
Penicillin/ Streptomycin	5 ml

2.2.4 Selektionsmedium für RKOp21 und RKOp27

Material	Menge
DMEM	500 ml
FKS	10 % (v/v)
Glutamin	10 ml
Penicillin/ Streptomycin	5 ml
G418	500 µg/ml
Zeocin	200µg/ml

2.2.5 Selektionsmedium für RKOp27-„All-in-one“

Material	Menge
DMEM	500 ml
FKS	10 % (v/v)
Glutamin	10 ml
Penicillin/ Streptomycin	5 ml
G418	2 mg/ml

2.2.6 Selektionsmedium für RKOp27-„neu“

Material	Menge
DMEM	500 ml
FKS	10 % (v/v)
Glutamin	10 ml
Penicillin/ Streptomycin	5 ml
G418	2 mg/ml
Hygromycin	500 µg/ml

2.2.7 Einfriermedium

Material	Menge
DMSO	10% (v/v)
FKS	90 % (v/v)

2.2.8 Trypsin-Lösung (1:10 mit PBS)

Material	Menge
Trypsin	0.05% (v/v)
EDTA	0,1% (w/v)

2.2.9 Zellkulturmaterial

Material	Lieferant
24-Well-Platte	Corning, NL
6-Well-Platte	Corning, NL
Centricon Einheiten (1000,000 NMWL)	Millipore, Eschborn
Gewebekulturschalen (10 cm und 14,5 cm)	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen (unbeschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (5, 10, 25 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Polypropylen (PP)-Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Steril-Filter (0,45µm)	Millipore, Eschborn
Transwell Kammern	Corning, NL
Zählkammer	Neubauer

2.3 Material für cytometrische und fluorometrische Analysen

2.3.1 PBS (pH=7,4)

Menge	Material
136 mM	NaCl
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
2,7 mM	KCl
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

2.3.2 Annexin V-Bindungspuffer

Konzentration	Material
10 mM	HEPES/NaOH pH7,4
140 mM	NaCl
2,5 mM	CaCl ₂

2.3.3 PI-Färbepuffer

Konzentration	Material
38 mM	Natriumcitrat, pH7,5
200 µg/ml	DNase freie RNase A
12,5 µg/ml	Propidium Iodid

2.3.4 7-AAD-Färbepuffer

Konzentration	Material
38 mM	Natriumcitrat, pH7,5
200 µg/ml	DNase freie RNase A
5 µg/ml	7-AAD

2.3.5 JC-1-Färbepufferpuffer

Konzentration	Material
10 µg/ml	JC-1
	PBS

2.3.6 Apo-BrdU-Kit von BD (TUNEL)

Komponente	Zusammensetzung
Waschpuffer	-
50 μ l DNA Markierungslösung	10 μ l Reaktionspuffer 0,75 μ l TdT 8 μ l Br-dUTP 32,25 μ l H ₂ O
Rinse Puffer	-
100 μ l Antikörper Färbelösung	5 μ l anti-BrdU-FITC-AK 95 μ l Rinse Puffer
PI/RNase Färbelösung	-

2.3.7 Permeabilisierungspuffer für intrazelluläre FACS-Messungen

Konzentration	Material
2 μ l	25 mg/ml Digitonin
998 μ l	PBS

2.3.8 Cytochrom c - Blockpuffer

Konzentration	Material
0,05% (w/v)	Saponin
3% (w/v)	BSA
	In PBS

2.3.9 BrdU-Färbung zur Bestimmung der S-Phase

Komponente	Konzentration/Menge	Material
-	60 μ M	BrdU
-	70%	Ethanol
Waschpuffer	0,5% ad 1 ml	BSA PBS
Denaturierungslösung	2M HCl	HCl
-	0,1M	Tris-HCl, pH8,8
AK Verdünnungspuffer	0,5% 0,5% 1 μ l ad 50 μ l	Tween-20 BSA Anti-BrdU-AK bzw. FITC-Anti-Maus-Ig PBS
PI Färbelösung siehe 2.3.4	500 μ l	PI + RNaseA

2.3.10 Caspase-Aktivitäts-Kit der Firma BioVision, Wertheim

Konzentration/Menge	Material
1 μ l	Ac-DEVD-AFC (Casp3-Substrat) bzw. Ac-IETD-AFC (Casp8-Substrat) bzw. Ac-LEHD-AFC (Casp9-Substrat)
50 μ l	Lysis Puffer
50 μ l	Reaktionspuffer
10 mM	DTT

2.3.11 Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper

Fluoreszenzfarbstoff	Lieferant
7-AAD	BD Pharmingen, Heidelberg
Ac-DEVD-AFC (Casp3-Substrat)	Alexis, Grünberg
Ac-IETD-AFC (Casp8-Substrat)	Alexis, Grünberg
Ac-LEHD-AFC (Casp9-Substrat)	Alexis, Grünberg
AnnexinV-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Apo1-3	Alexis, Grünberg
Anti-BrdU-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Caspase3-PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD95-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-TRAIL-R 1, R2, R3, R4	Immunex, Seattle, USA
CasPACE	Promega, Mannheim
CFSE (CFDA, SE)	Molecular Probes, Leiden, NL
DRAQ5	Alexis, Grünberg
JC-1	Molecular Probes, Leiden, NL
PI	Sigma, Taufkirchen

2.3.12 Sonstige Materialien

Material	Lieferant
Polystyren (PS)-Röhrchen (5 ml)	Falcon BD, Heidelberg
96well Platten (flacher Boden)	Corning, NL

2.4 Material für proteinbiochemische Analysen

Antikörper gegen	Lieferant
Akt	Santa Cruz, Heidelberg
β -Aktin	Santa Cruz, Heidelberg
Bcl-x _L	BD Pharmingen, Heidelberg
Caspase-3	Santa Cruz, Heidelberg
Caspase-8	Dr. K. Schultze-Osthoff
CD95	Alexis, Grünberg
Cdc 2	Oncogene, Bad Soden
clAP2	R&D Systems, USA
Cyclin B1	BD Pharmingen, Heidelberg
Cyclin D1	BD Pharmingen, Heidelberg
Cyclin D3	BD Pharmingen, Heidelberg
Cyclin E	BD Pharmingen, Heidelberg
Cytochrom c	BD Pharmingen, Heidelberg
FADD	BD Transduction Lab, Heidelberg
Flag	Sigma, Taufkirchen
FLIP	Alexis, Grünberg
Hase-HRP	Amersham, Freiburg
Maus-HRP	Amersham, Freiburg
Met	Santa Cruz, Heidelberg
p21	Santa Cruz, Heidelberg
p27	Santa Cruz, Heidelberg

p65	Santa Cruz, Heidelberg
P-Akt	Calbiochem, Bad Soden
PARP	BD Pharmingen, Heidelberg
Tubulin	Sigma, Taufkirchen
Ziege-HRP	Amersham, Freiburg

2.4.1 Lysispuffer für Gesamtzelllysate

Konzentration	Material
10 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂
10 mM	Tris-Hcl pH7,4
10%	SDS
100 nM	PMSF
1 Tablette auf 10 ml Puffer	Protease Inhibitor Mix

2.4.2 Lysispuffer zur Detektion phosphorylierter Proteine

Konzentration	Material
10 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂
10 mM	Tris-Hcl, pH7,4
5 mM	NaF
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	β-Glycerophosphat
10%	SDS
100 nM	PMSF
1 Tablette auf 10 ml Puffer	Protease Inhibitor Mix

2.4.3 TBS, pH 7,3

Menge	Material
1,2g	Tris
8,76g	NaCl
ad 1l	H ₂ O

2.4.4 DISC-Lysispuffer

Konzentration	Material
30 mM	Tris-Hcl, pH7,5
150 mM	NaCl
1 mM	PMSF
1 % (v/v)	Triton X -100
10%(v/v)	Glycerol
1 Tablette pro 10 ml Puffer	Protease Inhibitor Mix

2.4.5 Fraktionierungspuffer A

Konzentration	Material
250 mM	Saccharose
20 mM	Hepes-KOH, pH 7,4
10 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂

1,5 mM	Na-EGTA
1,5 mM	Na-EDTA
1 mM	DTT
1 Tablette pro 10 ml Puffer	Protease Inhibitor Mix

2.4.6 Fraktionierungspuffer B

Konzentration	Material
50 mM	Hepes
1% (v/v)	NP-40
10% (v/v)	Glycerol
1 mM	EDTA
2 mM	DTT
1 Tablette pro 10 ml Puffer	Protease Inhibitor Mix

2.4.7 Protein-Färbelösung

Konzentration	Material
5 μ l	Gesamtprotein Lysat
200 μ l	Roti-Quant
800 μ l	H ₂ O

2.4.8 Zusammensetzung PAGE-Trenngel (12,5%)

Volumen	Konzentration	Material
12,5 ml	30%	Acrylamid
7,5 ml	1,5M	Tris-HCl pH8,8
9,5 ml	-	H ₂ O
300 μ l	10%	SDS
20 μ l	-	TEMED
200 μ l	10%	APS

2.4.9 Zusammensetzung PAGE-Sammelgel

Volumen	Konzentration	Material
2,5 ml	30%	Acrylamid
3,7 ml	0,5M	Tris-HCl pH6,8
8,5 ml	-	H ₂ O
150 μ l	10%	SDS
10 μ l	-	TEMED
200 μ l	10%	APS

2.4.10 Probenpuffer

Volumen	Konzentration	Material
200 μ l	10%	SDS
100 μ l	0,5M	Tris-HCl pH6,8
97 μ l	-	H ₂ O
100 μ l	85%	Glycerin
3 μ l	2,5%	Bromphenolblau
3 μ l	-	β -Mercaptoethanol

2.4.11 SDS Laufpuffer 10x (5l)

Konzentration	Material
300g	Tris
75g	SDS
750g	Glycin
ad 5l	H ₂ O

2.4.12 Transferpuffer (Semidry-Blotpuffer) 10x (1l)

Konzentration	Material
58,2g	Tris
29g	Glycin
	H ₂ O

2.4.13 Transferpuffer (Semidry-Blotpuffer) 1x

Konzentration	Material
10%	10xBlotpuffer
20%	Methanol
	H ₂ O

2.4.14 Coomassie Gelfärbelösung (1l)

Konzentration	Material
450 ml	Methanol
100 ml	Eisessig
1g	Coomassie Blue R-250
ad 1l	H ₂ O

2.4.15 Entfärbelösung für Coomassiegele(1l)

Konzentration	Material
100 ml	Methanol
100 ml	Eisessig
ad 1l	H ₂ O

2.4.16 Blockmilch für Western Blot Analyse

Konzentration	Material
1% (w/v)	BSA
1% (w/v)	Milchpulver
0,5% (v/v)	Tween-20
	PBS

2.4.17 Blockmilch für Western Blot Analyse phosphorylierter Proteine

Konzentration	Material
10% (v/v)	10x TBS
5% (w/v)	Milchpulver
0,1% (v/v)	Tween-20
	H ₂ O

2.4.18 Waschpuffer für Western Blot Analyse phosphorylierter Proteine

Konzentration	Material
10% (v/v)	TBS
0,1% (v/v)	Tween-20
	H ₂ O

2.4.19 Antikörper-Verdünnungspuffer für Western Blot Analyse phosphorylierter Proteine

Konzentration	Material
10% (v/v)	TBS
5% (w/v)	BSA
0,1% (v/v)	Tween-20
	H ₂ O

2.4.20 Strip-Puffer (vor Gebrauch Zugabe von 1% β -Mercaptoethanol)

Konzentration	Material
62,5 mM	Tris-HCl pH6,7
0,2% (v/v)	SDS
	H ₂ O

2.4.21 Sonstige Materialien

Material	Lieferant
PVDF Membran	Millipore, Eschborn
Chromatographie (3MM) Papier	Whatmann, UK
Plastikküvetten	Ratiolab, Dreieich
Röntgenfilme (ECL-Hyperfilm)	Amersham, Freiburg
Glas-Homogenator	Roth, Karlsruhe
Cytokine Array	Hölzel Diagnostika GmbH, Köln
BenchMark Prestained Protein Ladder	GibcoBRL, Karlsruhe

2.5 Material für die Molekularbiologie

2.5.1 TBE-Puffer 10x (1l)

Menge	Material
108 g	TrisBase
55 g	Borat
40 ml	0,5M EDTA pH8,0
ad 1l	mit H ₂ O

2.5.2 DNA-Farbmarker

Volumen	Material
40 μ l	1kb DNA Größenmarker
560 μ l	H ₂ O

2.5.3 DNA-Probenpuffer (6x)

Konzentration	Material
---------------	----------

0,25% (w/v)	Bromphenolblau
0,25% (v/v)	Xylencyanol
15% (v/v)	Ficoll 400
	H ₂ O

2.5.4 RNA-Probenpuffer (6x)

Konzentration	Material
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
0,25% (v/v)	Ficoll 400
	H ₂ O

2.5.5 dNTP`s

dNTP`s	Lieferant
dATP (100 mM)	NLB
dCTP (100 mM)	NLB
dGTP (100 mM)	NLB
dTTP (100 mM)	NLB

2.5.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide	Lieferant
Primer p27-3' V Sequenz: 5`-tgc-cat-cct-ggc-tct-cct-3`	BioSpring
Primer p27-5' V Sequenz: 5`-tgc-ccg-agt-tct-act-aca-ga-3`	BioSpring
Primer All-5' Sequenz: 5`-aaa-ctc-atc-aat-gta-tct-3`	BioSpring
Primer All-3' Sequenz: 5`-act-atc-aca-gta-acc-tca-3`	BioSpring

2.5.7 Restriktionsverdau

Enzyme und Reaktionspuffer	Lieferant
Bgl II und NEB3-Puffer	NLB
Cla I , NEB4-Puffer und BSA	NLB
EcoRI und EcoRI-Puffer	NLB
Xba, NEB2-Puffer und BSA	NLB
Xho, NEB2-Puffer und BSA	NLB

2.5.8 Plasmid DNA

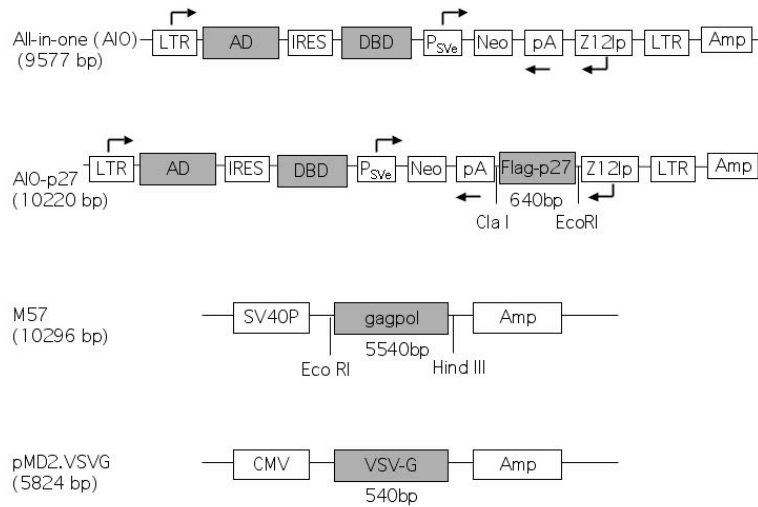
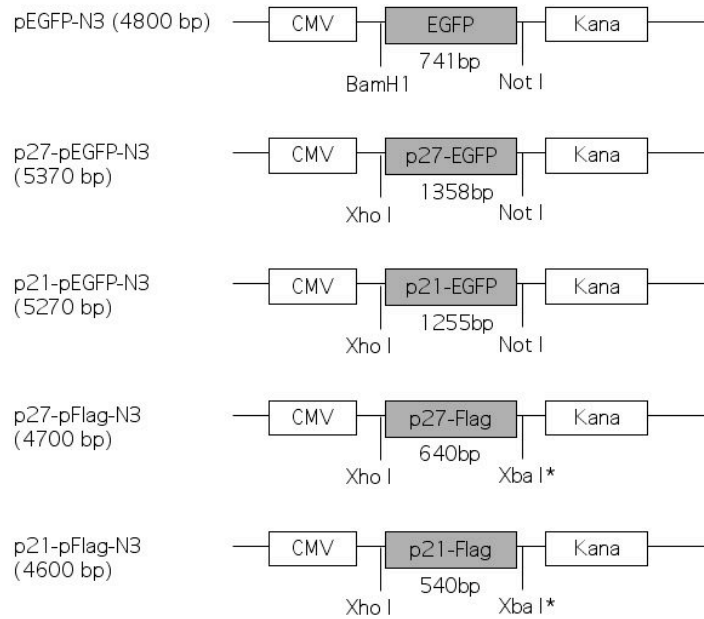
Plasmid DNA	Lieferant
pEGFP-N3	AG Möröy, Essen
P27-pEGFP-N3	AG Möröy, Essen
P21-pEGFP-N3	AG Möröy, Essen
P27-pFlag-N3	AG Möröy, Essen
P21-pFlag-N3	AG Möröy, Essen
pFlag-N3	AG Möröy, Essen
All-in -one -p27	-
All-in-one	AG Grez, GSH, Frankfurt
M57 (gagpol)	AG Grez, GSH, Frankfurt

pMD2.VSVG

AG Grez, GSH, Frankfurt

Plasmidkarten:

Alle Plasmide besitzen einen bakteriellen Replikationsursprung, einen SV40-Replikationsursprung und ein Polyadenylierungssignal.



2.5.9 Transfektionslösung (Calciumphosphatmethode)

Konzentration/Menge	Material
7µg	DNA
61µl	2M CaCl ₂
ad 500µl	H ₂ O
500µl	2xHBS

2.5.10 Kompetente Bakterien

Bakterien Stamm	Lieferant
DH5α	Gibco
JM110 (DAM negativ)	AG Grez, GSH, Frankfurt

2.5.11 LB Medium

Menge	Material
10g	LB Broth Base
Ad 500 ml	H ₂ O

2.5.12 Qiagen Maxi Präp Kit

Menge	Komponente
10 ml	P1
10 ml	P2
10 ml	P3
10 ml	QBT
30 ml	QC
15 ml	QF
Qiagen-tip 500 Säule	

2.5.13 DNA-Extraktionspuffer

Konzentration	Material
1% (v/v)	SDS
25 mM	EDTA pH 8,0
1 mg/ml	Proteinase K

2.5.14 Sonstige Materialien

Material	Lieferant
Agarplatten	Spülküche
Filter	Millipore, Eschborn
UV Quarzküvetten	Biorad, München

2.6 Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav 2540 EL	Systec, Wetztenberg
Blotter (Semi-Dry)	Amersham, Freiburg
CO ₂ -Brutschrank	Sanyo, Wiesloch
Elektrophorese Apparatur DNA Minisubcell für Agarosegele	BioRad, München
Elektrophorese Apparatur Gelkammer und -schlitten Modell Hoefer HE 33-GNA 200	Amersham, Freiburg
Elektrophorese Apparatur Vertical-Minigel MV 120	Savant, New York, USA
Feinwaage H10T	Satorius, Göttingen
Filmkassette Hypercassette	Amersham, Freiburg
Fluorometer Fluostar Optima	BMG Labtechnologies, Offenburg
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Gefrierschrank CFC Free (-80°C)	Sanyo, Wiesloch
Geltrockner Modell 483	BioRad, München

H eizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
K ühl(-4°C) und Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ludwigshafen
M agnetrührer IKA-Combimag RCH	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikrowelle B535	Moulinex, Solingen
P arafilm	Medox, Dietzenbach
Pasteurpipetten	Medox, Dietzenbach
pH-Meter PHM 83 autocal	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Photometer	Biorad, München
Pipetus-akku	Hirschmann, Neckartenzlingen
Pipetten 2, 20, 200, 1000 µl	Abimed, Düsseldorf
R eaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
S augpumpe Laboport (N86)	KNF Neuberger, Freiburg
SDS Gelelektrophorese Apparatur	Amersham, Freiburg
Spannungsgerät	Amersham, Freiburg
Sterilbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer-Griesheim, Düsseldorf
T ischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
U ltraschall-Desintegrator Sonifier 250	Branson Inc, Danbury, USA
UV-Schirm Transluminator	UVP Inc., San Gabriel, USA
UV-Cross-Linker Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
V ortexer Reax Top	Heidolph, Schwabach
W aage 1219MP und H10T	Satorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Z ellophanpapier	Biorad, München
Zentrifuge 2K15	Sigma, Taufkirchen
Zentrifuge Varifuge 3.2. RS	Heraeus, Hanau
Zentrifuge J2-21M/E mit Rotoren JA10, JA20	Beckmann, München
Zytometer FACSCalibur	Becton-Dickinson, Heidelberg

2.7 Kultivierung der Zellen

2.7.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet: RKO, HeLa, 293T, NIH 3T3 und CHO (vgl. 2.2.1). Bis auf CHO-Zellen wurden alle Zelllinien in DMEM mit 10% FKS (fötales Kälberserum), 2 mM Glutamin und 100U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Bei Zellen, die stabil Fremd-DNA exprimieren sollten (Genexpressionsysteme) wurde zusätzlich ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion zugegeben (2.2.4-6). CHO Zellen wurden in MEM- α mit 10% FKS, 2mM Glutamin und 100U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

2.7.2 Kryokonservierung der Zellen

Durch die Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C) kann ein Zellvorrat angelegt werden. Die Zellen können hier über Jahre konserviert werden, ohne dass ihre Lebensfähigkeit beeinträchtigt wird. Die Zellen werden in 90% FKS mit 10% DMSO eingefroren. Ein hoher Serumgehalt sorgt dafür, dass die Proteinkonzentration intra- und extrazellulär gleich bleibt, auch wenn DMSO die Membran permeabel macht. Das lipophile DMSO reduziert den Wassergehalt der Zelle, indem es in der Zelle als Frostschutz die Bildung von Eiskristallen verhindert, welche die Zellmembran zerstören würden.

Durchführung:

Adherente Zellen, die auf 10 cm-Petrischalen eine 70%ige Konfluenz erreichten, wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (1:10 mit PBS verdünnt) abgelöst. Dieser Prozess wurde durch Zugabe von 7 ml Kulturmedium abgestoppt und die Suspension in 15 ml Gefäße überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 200g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium suspendiert. Jeweils 1ml der Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt. Bei -80°C wurden die Zellen für 1-3 Tage zwischengelagert und anschließend in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt.

2.7.3 Auftauen der Zellen

Erreichen die Zellen im Versuchsablauf eine zu hohe Passagennummer oder wachsen die Zellen verlangsamt, ist es sinnvoll, kryokonservierte Zellen mit einer niedrigen Passagenzahl aufzutauen. Mit ansteigender Passagenzahl erhöht sich auch das Risiko, dass mutierte Zellklone selektioniert werden.

Um eine kontinuierliche Proliferationsrate der Zellen zu erhalten, werden die Zellen nach dem Auftauen zweimal passagiert, bevor sie für weitere Experimente verwendet werden können.

Durchführung:

Das Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstoffbehälter genommen und aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit 5 ml Kulturmedium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (200g, 5min) und das Medium abgenommen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Medium resuspendiert und in eine 10 cm Petrischale mit 5 ml Medium überführt.

2.7.4 Subkultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien wurde in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂/95% Luftfeuchtigkeit in 10 cm Petrischalen durchgeführt. Ein Wechsel des Nährmediums fand zweimal die Woche statt. Um Kontaminationen der Zellen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.7.5 Passagieren der Zellen

Die Zellen sollten passagiert werden, solange sie noch keinen konfluenten Zustand erreicht haben, bei dem sie sich nicht mehr teilen. Dazu werden sie trypsinisiert, wobei die Einwirkungsdauer optimiert sein sollte, denn zu lange Einwirkungszeiten können Zellen irreversibel schädigen. Eine optimale Einwirkungsdauer ist erreicht, wenn sich die Mehrzahl der Zellen von dem Schalenboden lösen, was durch leichtes Klopfen mit der Hand an die Schale und/oder Betrachten unter dem Mikroskop überprüft werden kann.

Durchführung:

Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen trypsinisiert und anschließend ausgesät oder in einer entsprechenden Verdünnung weiter passagiert. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen das alte Medium abgenommen und mit 1x 5 ml PBS pro 10cm Schale gewaschen. 1 ml einer Trypsinlösung wurde gleichmäßig über den Zellrasen verteilt und die Zellen damit im Brutschrank je nach Zelllinie 3-5 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 9 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Zur anschließenden Zellzahlbestimmung wurden 20 µl der Zellsuspension abgenommen. Für eine neue Subkultur wurde 1 ml Zellsuspension in eine neue 10 cm Schale gegeben und mit 9 ml Kulturmedium verdünnt.

2.7.6 Zellzahlbestimmung

Damit für alle Experimente gleiche Versuchsbedingungen vorlagen, wurden die Zellen in gleicher Aussaatdichte ausgesät. Hierfür wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Berechnung: $\text{Zellzahl/ml} = x \cdot \text{VF} \cdot 10^4$

Dabei entspricht x dem Mittelwert, der in vier Quadraten ausgezählten Zellen. Der Verdünnungsfaktor VF ergibt sich aus der Zugabe von 80 μl Trypanblaulösung zu 20 μl trypsinierte Zellsuspension. Da das Volumen in einem Quadrat 0,1 μl entspricht, muss zur Umrechnung auf 1 ml mit dem Faktor 10^4 multipliziert werden.

2.7.7 PolyHema Beschichtung

Eine Beschichtung steriler Bakterienchalen mit PolyHema (= Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate)) wird vorgenommen, um normalerweise adherierende Zellen im Versuchsablauf in Suspension zu halten. Dazu werden sterile, unbeschichtete Petrischalen benutzt und mit einem PolyHema-Film überzogen, um eine Anheftung der Zellen an der Oberfläche zu verhindern.

Durchführung:

Es wurden 5% PolyHema in Ethanol angesetzt und unter Bewegung (Roller) in ca. einer Stunde in Lösung gebracht. Anschließend wurden die sterilen Petrischalen zweimal mit 70% Ethanol gespült. Dann wurde der Boden der jeweiligen Schale mit 5%iger PolyHema-Lösung so überschichtet, dass ein dünner Flüssigkeitsfilm sichtbar war. Die Petrischalen trockneten über Nacht unter der Sterilbank, ehe sie zur Zellaussaat benutzt wurden.

2.7.8 Zellaussaat für Experimente

Um gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden die jeweiligen Zelllinien bis maximal zur 40. Passage benutzt.

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von entweder 1×10^5 Zellen (dünn) oder 2×10^6 Zellen (dicht) in 2 ml Kulturmedium pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden in 10 cm - Gewebekulturschalen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen (dünn) oder 2×10^7 Zellen (dicht) in 8 ml Kulturmedium pro Schale ausgesät.

2.7.9 Apoptoseinduktion

Zur Induktion von Apoptose wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase je nach Versuchsansatz (2.7.8) in Kulturschalen oder 6-Loch-Platten ausgesät. Nach eintägiger (24h) Kultivierung erfolgte die Behandlung mit apoptoseauslösenden Substanzen (Tab. 2.1).

Durchführung:

Die Zellen wurden für die in Tabelle 2.1 angegebene Dauer mit oder ohne Apoptoseinduktor inkubiert. Dazu wurden angesetzte Stammlösungen in einer 1:1000 Verdünnung zum Kulturmedium der Zellen zugegeben. Wurden Substanzen verwendet, die in Lösungsmitteln wie Ethanol oder DMSO gelöst waren, wurde zuvor eine Toxizität der eingesetzten Lösungsmittel-Konzentration ausgeschlossen (unter 1% in subG1). Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

Induktor	Konzentration	Inkubationszeit	Lösungsmittel	% Apoptose
hCD95L	(10) 20 ng/ml	5h, 16h (24h)	DMEM, 5% FCS	30% - 40%
TRAIL	(10) 20 ng/ml	5h, 16h (24h)	DMEM, 5% FCS	30% - 40%
Staurosporin	500 ng/ml	5h, 16h	DMSO	30% - 40%
UV	50 mJ/cm ²	16h	-	30% - 40%

Tab. 2.1: Apoptoseinduktion in RKO-Zellen. Um das Apoptoseverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden die hier aufgelisteten Substanzen verwendet. Da es sich bei RKO-Zellen um sog. TypII-Zellen handelt, wurde zur Apoptoseinduktion über die Todesrezeptoren Cycloheximid in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ gelöst in H_2O zugegeben. Zum Vernetzen wurde zusammen mit dem Flag-gekoppelten hCD95L auch ein anti-Flag-Antikörper in der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. TRAIL wurde als His-fusioniertes „Killer-TRAIL“ eingesetzt. Zur UV-Behandlung wurden die ausplattierten Zellen einer 50 mJ/cm² Bestrahlung ausgesetzt und über Nacht (16h) im Brutschrank inkubiert.

2.7.10 Untersuchung des Migrationverhaltens der Zellen

2.7.10.1 Migrationstest mit kollagenbeschichteten Transwell-Membranen

Der Migrationstest dient der Untersuchung der Wanderungsfähigkeit der Zellen in 3 μm große Poren einer mit Kollagen beschichteten Transwell-Membran, die mit einem Durchmesser von 6,5 mm in die Vertiefung einer 24-Loch-Platte passt.

Der Invasionstest dagegen (vgl. 2.7.10.2) stellt ein Modell der Zellinvasion durch die Basalmembran dar. Diese muss, um von den Tumorzellen passiert zu werden, durch deren proteolytische Enzyme degradiert werden. Durchgewanderte Zellen setzen sich in der unteren Kammer ab und werden hier mit Nährmedium versorgt (Abb. 2.1).

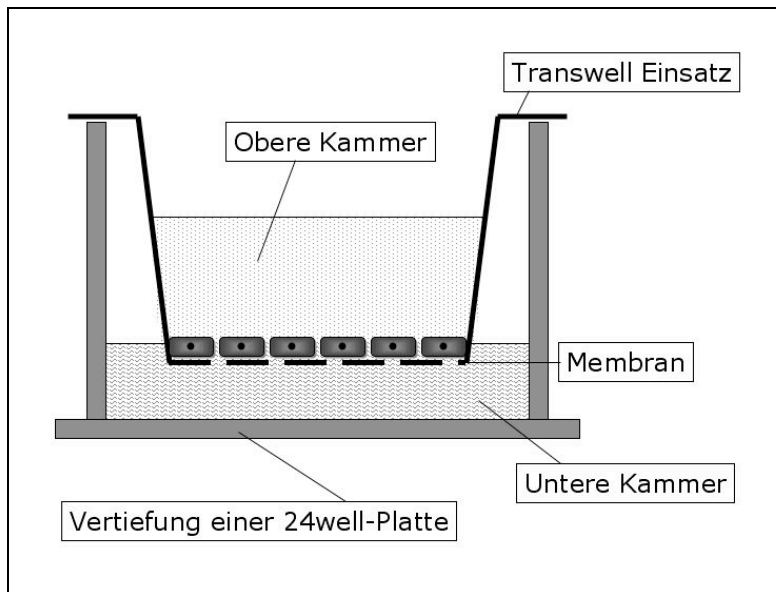


Abb. 2.1

Transwell-Kammer

Die Vertiefung einer 24-Loch-Platte wird mit 600 μl Medium gefüllt, der Transwell-Einsatz mit der Membran eingesetzt und 1×10^5 Zellen werden in 100 μl darauf ausplattiert. Nach Inkubation im Brutschrank werden in die Membran eingewanderte Zellen sowie in die untere Kammer durchgewanderte Zellen nachgewiesen.

Durchführung:

Es wurden 1×10^6 Zellen in Petrischalen ausplattiert und mit zu untersuchendem sowie mit Kontrollmedium für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gezählt und 1×10^6 Zellen in 1 ml ihres korrespondierenden Mediums resuspendiert. Die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte wurden mit 600 μl Standard-Zellkulturmedium gefüllt, die Transwell-Kammern eingesetzt und 100 μl der zu untersuchenden Zellsuspension (1×10^5 Zellen) zugegeben (Abb.2.1). Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden im Inkubator wurden nicht migrierte Zellen mithilfe eines Wattestäbchens entfernt und die Membran durch mehrmaliges Eintauchen und Schwenken in PBS gewaschen. In die Membran migrierte Zellen wurden durch 20-minütiges Baden in 4%igen Formaldehyd fixiert und durch Eintauchen in 0,1%ige Kristallviolettlösung für 5 Minuten angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Schwenken der Membranen in H_2O entfernt. Die getrockneten Membranen wurden im Mikroskop analysiert und fotografiert. Eventuell in die untere Kammer durchgewanderte Zellen wurden ebenfalls fotografiert.

2.7.10.2 Migrations- und Invasionstest mit CFSE Färbung

Prinzip dieser selbst entwickelten Methode ist es, die Zellen zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE zu färben, um dann die Zahl der in die Membran ein- oder durchgewanderten CFSE-positiven Zellen im Fluoreszenzmikroskop bzw. FACS-Gerät zu quantifizieren.

Durchführung:

Es wurden 1×10^6 Zellen in Petrischalen ausplattiert und entsprechend der Fragestellung behandelt.

Anschließend wurden die Zellen geerntet, gezählt und 1×10^6 Zellen in 1 ml Medium gelöst, um dann, wie unter 2.8.9 beschrieben, mit CFSE gefärbt zu werden. In der Zwischenzeit wurde 600 μ l Nährmedium in die Vertiefungen der 24-Loch-Platte vorgelegt, die Transwell-Kammern mit der Polycarbonatmembran (8 μ m Poren) eingesetzt und dann die CFSE-gefärbten Zellen in ihrem entsprechenden Medium auf die Membranen ausgesät (100 μ l mit 10^5 Zellen, siehe 1.2.1). Das Nährmedium in der unteren Kammer versorgt die durchgewanderten Zellen.

Nach einer Inkubationszeit von 6h bei 37°C im Inkubator wurden die 600 μ l der unteren Kammer in FACS Röhren überführt und auf CFSE positive Zellen im FL1-Kanal untersucht. Dabei wurden alle Proben exakt 4 Minuten vermessen und mit den Kontrollzellen verglichen. Eine zusätzliche Probe wurde für die Geräteeinstellung benutzt. Die Membranen wurden wie unter 2.7.10.1 beschrieben gewaschen, getrocknet und schließlich im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.7.11 Synchronisation proliferierender Zellen

2.7.11.1 Serumentzug

Durch Entzug von Serum treten die Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus ein. Durch ein neues Wachstumsfaktorsignal, z.B. erneute Zugabe von Serum, lassen sie sich wieder zur Teilung anregen. Dies kann dazu genutzt werden, um die Zellen in G₁/G₀ zu sammeln und dann das Apoptoseverhalten dieser synchronisierten Population zu untersuchen (Yen & Pardee 1978).

Durchführung:

Für die Synchronisation durch Serumentzug wurden RKO-, NIH 3T3- und CHO-Zellen (siehe 2.2.1) benutzt. Hierzu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Während die Zellen sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde das serumhaltige Medium abgenommen und jeder Zellansatz zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde serumreduziertes Medium zu den Zellen gegeben, 24-72 Stunden später wieder abgenommen und durch Medium mit 10% FKS ersetzt. Nun erfolgte das Ernten des 0h Wertes, zu dessen Zeitpunkt die Zellen sich größtenteils in der G₀/G₁-Phase gesammelt hatten. Dem Nullwert folgten 16h-, 18h-, 20h-, 22h- und 24h-Werte. Um das Apoptoseverhalten zu untersuchen, wurde für jeden Zeitwert 2h vor der Ernte ein Apoptosestimulus in sehr hoher Konzentration (z.B. 100 ng/ml hCD95L) zugegeben.

2.7.11.2 Zugabe von Zellzyklusblockern

Eine weitere Möglichkeit, die Zellen in einer Zellzyklusphase zu synchronisieren, stellt die Behandlung mit Zellzyklusarrest auslösenden Substanzen dar. Die jeweilige Funktion sowie die eingesetzten Konzentrationen und die Auswirkungen auf die Zellzyklusverteilung der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Durchführung:

Hierzu wurden RKO-Zellen (vgl. 2.2.1) mit Substanzen behandelt, um sie in einer bestimmten Phase des Zellzyklus zu arretieren und dann das Apoptoseverhalten der arretierten Zellen zu untersuchen. Um Nebeneffekte der Substanzen selbst auszuschließen, wurden diese nur genutzt, um die Zellen in der jeweiligen Phase zu sammeln. Danach wurden die Substanzen mit PBS abgewaschen und substanzfreies Nährmedium zu den Zellen gegeben. Zu definierten Zeitpunkten wurde Apoptose ausgelöst und quantifiziert.

Substanz	Arbeits-Konzentration	Arrest in	Lösungsmittel	Funktion
Daidzein	25 μ M	G0/G1	DMSO	Hemmt Caseinkinase II (Higashi & Ogawara 1994)
Mimosin	100 μ M	G0/G1	HCl	Hemmt SHMT, erhöht p27 (Watson et al. 1991, Wang et al. 2000)
Aphidicolin	1 μ M	S	DMSO	Hemmt α -Typ Polymerase (Lalande 1990)
Genistein	25 μ M	G2/M	DMSO	Hemmt Tyrosinkinase (Linassier et al. 1990)
Nocodazol	5 μ M	G2/M	DMSO	Baut Microtubuli ab (Zieve et al 1980)

Tab. 2.2: Zur Synchronisation verwendete Substanzen.

In der jeweiligen Konzentration lösten die Substanzen einen Arrest in der aufgelisteten Zellzyklusphase aus. Die Lösungsmittel wurden nicht höher als 0,1% eingesetzt und zuvor auf Zytotoxizität getestet. Da die jeweiligen Substanzen in Signaltransduktionswege eingreifen (Funktion), wurden sie nur zur Synchronisation verwendet und wieder abgewaschen, bevor Apoptose ausgelöst wurde. SHMT: Serin-Hydroxymethyl-Transferase

2.7.12 Transfektion der in Kultur gehaltenen Zellen

Transfektion ist eine Bezeichnung für das Einschleusen fremder Nukleinsäure in Zellen. Bei der Calciumphosphat-Transfektionsmethode werden in Gegenwart der zu untersuchenden DNA Calciumchlorid und Natriumphosphat unter genauen Bedingungen miteinander gemischt. Dabei entsteht eine Suspension von unlöslichem Calciumphosphat, an das sich die DNA über elektrostatische Anziehungskräfte bindet. Diese Suspension wird dann zu Zellkulturen gegeben, wobei sich die Calciumphosphatkristalle mit gebundener DNA auf der Oberfläche der Zellen absetzen und durch

Endocytose in die Zellen aufgenommen werden. Die DNA gelangt in den Zellkern, wo sie sofort transient transkribiert werden kann und bei gleichzeitiger Selektion stabil in das Genom der Säugerzelle integriert. Zur Selektion werden die durch Integration der Fremd-DNA erhaltene Antibiotika Resistenzen zunutze gemacht. Um indirekt die Effizienz zu erhöhen, wird Chloroquin zugegeben, welches den DNA-Abbau durch Ansäuerung der Lysosomen hemmt (Luthman & Magnusson 1983).

Durchführung:

Zur Transfektion von Zellen wurde die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode verwendet. Für eine 10 cm Kulturschale wurde 7 µg DNA zu einer Lösung aus 61 µl einer 2M CaCl₂-Lösung gegeben und mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurde zu diesem Gemisch langsam und unter „Durchblubbern“ mit Luft 500 µl 2xHBS getropft, dabei gut gemischt und 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das hierbei gebildete Präzipitat wurde zu 4x10⁶ am Tag zuvor ausplattierten Zellen gegeben, deren Medium 1 µl Chloroquin in 3 ml Zellkulturmedium enthielt. 16 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 bis 48 Stunden für weitere Experimente verwendet. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde eine pEGFP-Transfektion durchgeführt und die Fluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

2.7.13 Retrovirale Transduktion und Virusüberstandkonzentration

Mit Hilfe von Retroviren können Zielzellen infiziert und somit Fremd-DNA-Kopien in das Wirtschromosom integriert werden. Zur Produktion können 293T-Zellen (2.2.1) genutzt werden, da diese Zelllinie stabil das große T-Antigen aus SV40 exprimiert. Die zur Virusproduktion notwendigen Plasmide enthalten je einen SV40-Replikationsursprung, so dass nach der Transfektion die Plasmide innerhalb der Zellen repliziert werden können, was zu einer höheren Anzahl von viralen Transkripten und Proteinen in den Zellen und letztlich zu mehr viralen Partikeln im Kulturüberstand führt.

Durchführung:

Um virale Partikel in 293T-Zellen zu produzieren wurde die Calciumphosphat-Transfektionsmethode gewählt. Insgesamt wurden drei Plasmide kotransfiziert: Transgenvektor (20 µg), M57 (13 µg, enthält *gag* und *pol*) und pMD2.VSVG (7 µg, kodiert für das Hüllprotein VSV-G). 24 Stunden später wurde das Medium (6ml) von den Kulturschalen gesammelt, zentrifugiert (5min, 300g) und steril filtriert (0,45 µm Filter). Dabei wurden Zellen und Zelltrümmer von den Viruspartikeln abgetrennt. Nun wurden die für die Aufkonzentration benötigten Centricon-Einheiten sterilisiert, indem sie mit 15 ml 70%Ethanol

befüllt und 3 Minuten bei 2000g zentrifugiert wurden. Zum Abwaschen des restlichen Ethanol wurde dieser Schritt zweimal mit PBS wiederholt. Schließlich wurde der Virusüberstand in die Centricon-Einheiten gegeben und solange bei 10°C zentrifugiert (in 5 Minuten-Schritten), bis das gewünschte Volumen (1ml) vorlag. Das Konzentrat wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und zusammen mit 1% Polybren auf die zuvor in einer 24-Loch-Platte ausplattierten Zielzellen (RKO) gegeben. Nun wurden die Platten, um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, mit 1250g 90 Minuten lang bei 32°C zentrifugiert und anschließend im Brutschrank über Nacht (16h) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Virusüberstand abgenommen und Zellkulturmedium zugegeben, welches nach einem weiteren Tag mit Selektionsmedium (zur Produktion stabiler Zelllinien) ausgetauscht wurde.

2.8 Durchflußzytometrische und fluorometrische Analysen

Alle Messungen wurden am Durchflußzytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm CellQuestTM Pro benutzt.

Mit Hilfe eines Durchflußzytometers (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter) können einzelne Zellen hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften wie Größe, Form oder Granularität und ihrer biochemischen Merkmale wie Oberflächenrezeptoren oder Zellbestandteilen (z.B. DNA) näher charakterisiert werden.

Die Zellen werden in einer Suspension mit Überdruck nacheinander durch eine Messkammer geführt, in der sie von einem fokussierten Laserstrahl beleuchtet werden. Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie das Licht aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften in charakteristischer Weise. Dies kann mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Hierbei spiegelt die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich (FSC) die Zellgröße wieder. Das Seitwärtsstreulicht (SSC), gemessen im 90° Winkel zum einfallenden Licht, wird von Granularität, Membranfaltung und äußerer Form der Zellen beeinflusst.

Fluoreszenz-markierte Zellen werden durch eine Kapillare eingesogen, in die Messkammer geleitet und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge λ 488 nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts ist von dem jeweils verwendeten Fluorochrom abhängig und wird im FL1 (530±30 nm)-, FL2 (585±42 nm)- oder FL3 (650 nm und größer)-Kanal detektiert. Das Licht wird dabei von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass viele Zellen gleichzeitig auf Einzelzellniveau analysiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Fluorochromen gearbeitet (Tab. 2.3):

Fluorochrom	Detektionskanal	2.8.1.1.1 Emission
7-AAD	FL3	650 nm
CFSE	FL1	525 nm
DRAQ	FL3	670 nm
EGFP	FL1	507 nm
FITC	FL1	530 nm
JC-1	FL1/FL2	525 nm / 590 nm
PE	FL2	575 nm
PI	FL2 und FL3	562-588 nm

Tab. 2.3: Detektion verwendeter Fluorochrome im FACS.

Nach Anregung durch die 488 nm Laserlinie kann emittiertes Licht, abhängig von Probenvorbereitung und Wellenlänge der Fluorochrome, im entsprechenden Detektionskanal nachgewiesen werden. Die dabei gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle und wird im 90° Winkel zum einfallenden Licht detektiert.

2.8.2 Oberflächenfärbung membranständiger Proteine

Zur Erfassung membranständiger Proteine, z.B. Rezeptoren, werden Antikörper mit fusioniertem Fluorochrom benutzt, die spezifisch an das Zielprotein binden und über das Fluorochrom im FACS detektiert werden können.

Durchführung:

Die zu untersuchenden Zellen wurden entsprechend der Fragestellung in eine 6-Loch-Platte ausplattiert, vorsichtig mit einem Zellschaber geerntet und mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden nicht mit Hilfe von Trypsin abgelöst, um eine Proteolyse der Oberflächenstruktur zu vermeiden. Nach Zentrifugation bei 500 g für 3 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit Erstantikörper in PBS für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen, zentrifugiert und mit FITC-markiertem Zweitantikörper gegen den ersten Antikörper in PBS für 30 Minuten auf Eis und lichtgeschützt inkubiert. Es kann auch direkt mit FITC markiertem Erstantikörper gefärbt werden. Dann wurden die Proben wieder mit PBS gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in 400 µl PBS resuspendiert, um daraufhin im FL1-Kanal des Durchflußzytometers vermessen zu werden.

2.8.3 Erfassung frühapoptotischer Zellen mittels Annexin V-Anfärbung

Im Zuge der Apoptose finden Veränderungen an der Zelloberfläche statt. Ein frühes Ereignis ist dabei der Verlust der Asymmetrie in der Verteilung der Zellmembranphospholipide. In lebenden Zellen befinden sich anionische Phospholipide wie z.B. das Phosphatidylserin hauptsächlich an der Innenseite der Zytoplasmamembran, während neutrale Phospholipide sich an der äußeren Seite befinden.

Wird Apoptose ausgelöst, translozieren Phosphatidylserine aktiv in die äußere Membran. Phagozytierende Zellen erkennen diese und entfernen die apoptotischen Zellen. Annexin V, welches kalziumabhängig an Phospholipide bindet, weist eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin auf und kann daher z.B. als FITC-markiertes Annexin V benutzt werden, um apoptotische Zellen im FACS zu identifizieren (Koopman et al. 1994).

Zusätzliche Inkubation mit Propidiumiodid (PI) wird benutzt, um zwischen lebenden, früh-apoptotischen (Annexin V positiv), spät apoptotischen (Annexin V und PI positiv) oder nekrotischen (PI positiv, u.U. ebenfalls AV positiv) Zellen zu unterscheiden.

Durchführung:

Die adherenten Zellen wurden in 6-Loch-Platten je nach Fragestellung ausplattiert. Nach Überführung des Überstandes in FACS-Röhrchen wurden die Zellen in der 6-Loch-Platte mit Annexin V-Bindungspuffer (2.3.2) gewaschen und mit FITC-fusioniertem Annexin V in 900 µl Bindungspuffer 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Suspension in den FACS-Röhrchen wurde bei 500 g für 3 Minuten zentrifugiert und das Pellet ebenfalls mit FITC-fusioniertem Annexin V in 100µl Bindungspuffer 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die adherenten Zellen der 6-Loch-Platte vorsichtig mit einem Zellschaber geerntet und mit den Zellen aus dem Überstand im FACS Röhrchen vereint. Anschließend wurden 0,5 mg/ml PI zugegeben und die Proben zügig am FACS (FL1/FL2) vermessen, um unspezifische Hintergrundfärbung so gering wie möglich zu halten.

2.8.4 Bestimmung der Zellzyklusverteilung und Apoptosequantifizierung mithilfe von PI (Nicoletti)

DNA-Fragmentierung ist ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen. Demzufolge macht es die Messung des DNA-Gehaltes in fixierten, permeabilisierten Zellen nicht nur möglich, Zellzyklusphasen zu identifizieren, sondern auch apoptotische Zellen zu quantifizieren. Um den relativen DNA-Gehalt mittels Durchflußzytometrie zu vermessen, wird Propidiumiodid (PI) benutzt, welches in DNA und RNA interkaliert.

Nach Permeabilisierung der Zellen mit Ethanol und Verdau der RNA mit RNase A bindet PI proportional an DNA aller Zellzyklusphasen und die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle.

Die Messergebnisse werden im Histogramm dargestellt, indem die Zellzahl (counts) gegen die relative Fluoreszenzintensität von PI (FL2A) aufgetragen wird (Abb. 2.2). Das Histogramm reflektiert somit die Zellzyklusverteilung der Zellpopulation, wobei der Hauptanteil sich in G₀/G₁ (DNA Gehalt: 2n)

befindet. Zellen in G2/M fluoreszieren doppelt so stark (DNA Gehalt: $2x2n$). Zellen der S-Phase befinden sind gerade dabei neue DNA zu synthetisieren (DNA Gehalt: $2n - 2x2n$). Apoptotische Zellen erscheinen mit verminderter Fluoreszenz im subG1-Bereich (hypoploid), da die fragmentierte DNA aus dem permeabilisierten Kern heraus diffundiert. Der zur Messung benutzte hochmolekulare Natriumcitrat-Puffer verstärkt dabei die Extraktion der fragmentierten DNA (Nicoletti et al. 1991).

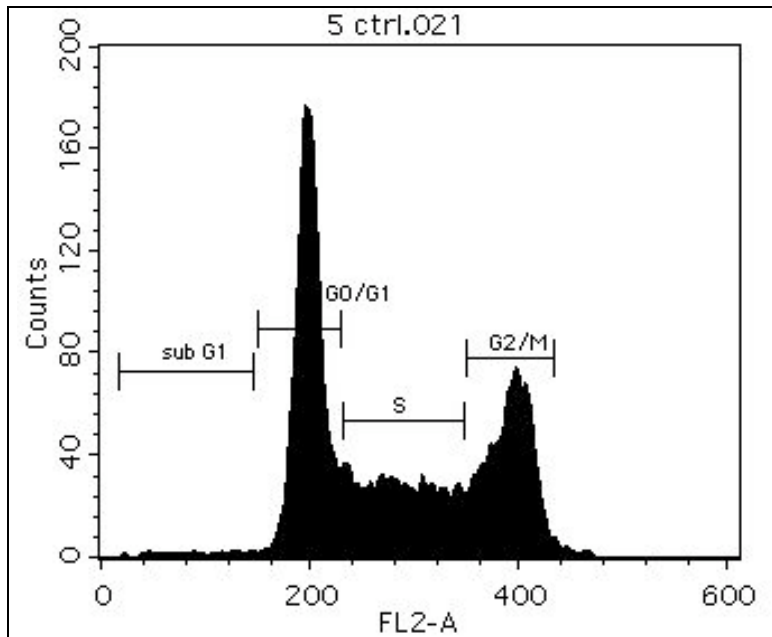


Abb. 2.2:

Zellzyklusverteilung im FL2-A-Histogramm:

Das im FL2-Kanal detektierte und dargestellte Fluoreszenzsignal ermöglicht die Darstellung der Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation. Zellen mit einfachem DNA-Gehalt ($2n$) der G0/G1-Phase sammeln sich im Bereich von 200, Zellen der G2/M-Phase, d.h. mit doppeltem DNA Gehalt ($2x2n$) bei 400 und Zellen die sich in der S-Phase befinden, erscheinen im Bereich dazwischen. Apoptotische hypodiploide Zellen erscheinen im „subG1“-Bereich.

Durchführung:

Die zu untersuchenden Zellen wurden je nach Versuchsansatz (2.7.8) ausplattiert und nach entsprechender Behandlung (2.7.9) mithilfe eines Zellschabers in FACS-Röhrchen geerntet. Nach Pelletierung der Zellen bei 500g für 3 Minuten wurden die Zellen mit eiskaltem 70%igen Ethanol fixiert und permeabilisiert. Dazu wurde 1 ml der Ethanol-Lösung tropfenweise und unter Vortexen zu dem Zellpellet gegeben. Die Röhrchen wurden verschlossen und über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Proben mit Natriumcitrat-Puffer (38mM, pH7,5) gewaschen und mit jeweils 400µl PI-Puffer (2.3.3) 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die Proben am FACS im FL2-Kanal, aufgetrennt in FL2-A und FL2-W („Doublet Discrimination Modul, DDM“), vermessen.

2.8.5 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ mittels JC-1

Mitochondriale Dysfunktionen während der Apoptose gehen meistens mit Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials einher. Eine Möglichkeit, den Abfall des mitochondrialen Membranpotentials zu erfassen, ist die Anfärbung mit JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-

Benzimidazolylcarbocyaniniodid), einem kationischem Farbstoff mit potentialabhängiger Fluoreszenzemission. So akkumuliert JC-1 unter dem Einfluss des Potentials in der mitochondrialen Matrix und bildet rote Fluoreszenz-Aggregate (590 nm). Mitochondriale Depolarisierung hingegen führt zur Auflösung der JC-1-Aggregate und erhöht die grün fluoreszierende (525 nm) monomere Form (Smiley et al. 1991).

Durchführung:

Behandelte und unbehandelte Kontrollzellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und das Pellet in 500 µl JC-1 Färbepuffer (2.3.5) gelöst. Nach 20-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, um die Färbereaktion zu stoppen und die Proben vergleichbar zu halten, und dann im FACS vermessen (FL1/FL2). In der anschließenden Analyse wurde das Verhältnis FL1 positiver (depolarisiert) zu FL2 positiver (lebend) Zellen bestimmt. Bei einem Faktor größer 1 besaß der Hauptanteil der Zellpopulation ein depolarisiertes mitochondriales Membranpotential.

2.8.6 Erfassung der DNA-Fragmentierung mithilfe der TUNEL-Methode

Eine weitere Möglichkeit, die DNA-Fragmentierung, d.h. die Generierung charakteristischer DNA-Strangbrüche im Nukleus, zu messen, stellt die TUNEL-Methode dar.

Die 3'-OH-Enden der Strangbrüche können durch indirektes Anhängen eines Fluorochroms nachgewiesen werden. Dazu werden Deoxynukleotide benutzt, welche in einer von exogen zugegebener TdT (terminale Deoxynucleotidyltransferase) katalysierten Reaktion angebaut werden. Am besten geeignet ist hierbei das BrdU (Bromodeoxyuridin). Das an die DNA-Strangbrüche angehängte Poly-BrdU kann durch Einsatz von FITC-konjugierten anti-BrdU-Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Methode erfordert eine Vorfixierung mit Formaldehyd, damit fragmentierte DNA nicht durch Diffusion verloren geht. Diese als TUNEL (Terminale desoxynukleotidy-Transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) bezeichnete Methode kann mit anderen Techniken kombiniert werden. So wird in Kombination mit Propidiumiodid parallel zur Apoptose auch die Zellzyklusverteilung der Zellpopulation erfasst (Kaufmann et al. 2000).

Durchführung:

Es wurde das Apo-BrdU-Kit der Firma Becton Dickinson benutzt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend der Arbeitsvorschrift des Herstellers durchgeführt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden je nach Fragestellung ausplattiert, behandelt und schließlich in vorbereiteten FACS-Röhrchen mitsamt Überstand geerntet. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 500g

für 5 Minuten; der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 ml 4%igen Formaldehyd vorfixiert. Erneut wurde die Probe mit PBS gewaschen und das Zellpellet schließlich mit 70%igen Ethanol 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde die Probe mit im Kit enthaltenen Waschpuffer (2.3.6) gewaschen, um anschließend zur DNA-Markierung 60 Minuten bei 37°C mit DNA-Markierungslösung (2.3.6) inkubiert zu werden. Nach einem Waschschrift mit „Rinse“ (2.3.6) erfolgte dann die Inkubation mit FITC-gekoppelten anti-BrdU-Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen. Zuletzt wurde die Probe mit PI/RNase Lösung (2.3.6) 30 Minuten bei Raumtemperatur und ebenfalls im Dunkeln gefärbt. Schließlich erfolgte die Messung der Fluoreszenz am FACS-Gerät in den Kanälen FL1 (FITC) und FL3 (PI).

2.8.7 Anfärben intrazellulärer Zellbestandteile zur durchflußzytometrischen Vermessung

Das Anfärben intrazellulärer Proteine, z.B. mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern, erfordert die Permeabilisierung der Zellen. Hierzu werden die Zellen erst fixiert, damit die Zellbestandteile untereinander vernetzt werden und nach der Permeabilisierung der Zellinhalt beim Waschen nicht durch Diffusion verloren geht. Schließlich wird mithilfe eines Detergens die Plasmamembran durchlässig gemacht. Nun können z.B. Antikörper genutzt werden, die an intrazelluläre Proteine binden und deren Nachweis ermöglichen. Ein mit Fluorochrom fusionierter Zweitantikörper erlaubt schließlich die Detektion im Durchflußzytometer.

Durchführung:

Entsprechend der Versuchsfragestellung wurden die Zellen in 6-Loch-Platten ausplattiert und behandelt. Nach dem Ernten und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml 4%Formaldehyd und 1 ml PBS vermischt und fixiert. Hierzu wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen und zentrifugiert (500g, 3min).

Zur Permeabilisierung wurden die Zellen in 1 ml Permeabilisierungspuffer (2.3.7) resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS und nach der Zentrifugation wurden die Zellen mit Erstantikörperlösung (1µl/200 µl PBS) versetzt und mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Erneut wurde mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert, um dann mit Fluorochrom markiertem Zweitantikörper (1µl/200 µl PBS) 30 Minuten auf Eis zu färben. Daraufhin wurden die Proben mit PBS gewaschen, in 500 µl PBS resuspendiert und am FACS

vermessen. Eine zusätzliche Anfärbung z.B. mit 7-AAD kann durchgeführt werden, um die Verteilung im Zellzyklus zu untersuchen (vgl. 2.8.7).

Modifiziertes Protokoll für Cytochrom c:

Zur Messung der Cytochrom c - Freisetzung nach apoptoseauslösenden Stimuli wird ein modifiziertes Protokoll der intrazellulären Anfärbung benutzt. Um eventuell aus den Mitochondrien in das Zytosol gewandertes Cytochrom c zu entfernen, werden die Zellen zuerst permeabilisiert und anschließend fixiert. Der dann gemessene Gesamtgehalt an Cytochrom c in den Mitochondrien gibt Aufschluss darüber, ob Cytochrom c freigesetzt wurde, da es in diesem Falle aus dem Zytosol der permeabilisierten Zellen gewaschen wird, und der zelluläre Cytochrom c-Gehalt sich somit stark vermindert hat.

Durchführung:

Hierzu wurden die Zellen in FACS Röhren geerntet, mit PBS gewaschen, zentrifugiert (500g, 3min) und schließlich mit Permeabilisierungspuffer (2.3.7) 5 Minuten permeabilisiert. Die Röhren wurden mit PBS aufgefüllt, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Proben mit Formaldehyd fixiert. Hiernach wurde dreimal mit PBS gewaschen und zum Abblocken 1 Stunde in Blockpuffer (2.3.8) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit Erstantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert, danach dreimal mit PBS gewaschen und 40 Minuten mit Zweitantikörperlösung auf Eis gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Proben im FACS vermessen.

Antikörper	Klon	Immunglobulin	Spezies/erkennt	Zweitantikörper
α -Cyclin B1	GNS-1	IgG1	Maus / Human	α -mouse-FITC
α -Cyclin D1	DCS-6	IgG2a	Maus / Human	α -mouse-FITC
α -Cyclin D3	G107-565	IgG1	Maus / Human	α -mouse-FITC
α -Cyclin E	HE12	IgG1	Maus / Human	α -mouse-FITC
α -Cytochrom c	6H2.B4	IgG1	Maus / Human	α -mouse-FITC
α -Caspase3-PE	-	-	Hase / Human	-

Tab. 2.4: Erstantikörper und die damit benutzten fluorochromgekoppelten Zweitantikörper.

Zur Anfärbung intrazellulärer Proteine wurden die hier aufgelisteten Antikörper in einer 1:200 Verdünnung eingesetzt. Ein fluoreszierender Zweitantikörper bindet an den Primärantikörper und ermöglicht somit den Nachweis des Proteins im Zytometer.

2.8.8 Nachweis aktiver Caspase-3 im FACS

Caspasen werden durch transkatalytische Spaltung ihrer zymogenen Procaspasen in große und kleine Untereinheiten aktiviert. Die Untereinheiten bilden dann aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten ein Heterotetramer, das aktive Caspase-Molekül. Mithilfe von Antikörpern, die spezifisch

und ausschließlich aktive Caspasen, z.B. Caspase-3, erkennen, ist es möglich, immunzytochemisch Caspaseaktivität nachzuweisen. Wird dies zudem mit einer Anfärbung der intrazellulären DNA, z.B. mit 7-AAD, kombiniert, ist es möglich, Caspaseaktivität und Zellzyklusverteilung (FL3-Kanal mit DDM) simultan zu bestimmen.

Durchführung:

Die auf Caspaseaktivität zu untersuchenden Zellansätze wurden geerntet, mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen. Nachdem jede Probe gut durchmischt war, wurde 1 ml Formaldehyd (4%) zur Vorfixierung zugegeben. Auf die 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und das anschließende Waschen mit PBS folgte die Permeabilisierung mit Permeabilisierungspuffer (2.3.7) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Einem erneuten Waschvorgang folgte die Inkubation mit PE-fusionierten Antikörpern gegen aktive Caspase-3 für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und mit 7-AAD Färbelösung (2.3.4) 15 Minuten bei 37°C gefärbt und am FACS vermessen.

2.8.9 Erfassung der Zellzyklusverteilung GFP-exprimierender Zellen mittels Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5

Um die Zellzyklusverteilung und das Apoptoseverhalten z.B. von p27EGFP-exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurde ein zellpermeabler DNA-Farbstoff (DRAQ5) gewählt. Somit besteht keine Gefahr, GFP nach Permeabilisierung der Zellen zu verlieren. DRAQ5 gelangt in kürzester Zeit in die Zelle und färbt die genomische DNA (in vernachlässigbarem Ausmaß auch RNA) der Zelle an.

Durchführung:

24-48 Stunden nach Transfektion wurden nach Überprüfung der GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop die Zellen geerntet. 1 ml der Zellsuspension wurde in ein FACS Röhrchen überführt und mit 1 µl DRAQ (5µM) 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Eis gestellt, gewaschen, in 400 µl PBS resuspendiert und schließlich im FACS vermessen, wobei GFP positive Zellen im FL1-Kanal detektierbar waren und die DRAQ Fluoreszenz proportional zum DNA-Gehalt der Zelle in FL2 erfasst wurde. In der anschließenden Analyse wurde die Zellzyklusverteilung der GFP-positiven Zellen ausgewertet.

2.8.10 Bestimmung des Proliferationsverhaltens über CFSE- Färbung

Eine Möglichkeit, das Proliferationsverhalten von Zellen zu untersuchen, stellt die Anfärbung mit CFSE (CFDA, SE: carboxy fluorescein diacetate) dar. Dieser Farbstoff liegt als zellpermeabler Ester vor und wird in der Zelle durch Esterasen zu CFSE hydrolysiert, wonach das Molekül nicht mehr permeabel ist, kovalent an Proteine bindet und irreversibel im Zytoplasma der Zelle verbleibt. Teilt sich die Zelle, teilt sich der Anteil an CFSE auf die zwei neu entstandenen Tochterzellen auf, d.h. der Fluoreszenzgehalt dieser Zellen halbiert sich. Dies kann im FACS quantifiziert und zur Analyse von Proliferation bzw. Zellteilung genutzt werden. CFSE kann auch zur Markierung von Zellen mit Fluoreszenz genutzt werden (vgl. 2.7.10).

Durchführung:

Die trypsinisierten RKO-Zellen wurden gezählt und 1×10^6 Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit PBS aufgefüllt, bei 200g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspendierung des Zellpellets in 1 ml PBS und Anfärbung mit $5 \mu\text{M}$ CFSE für exakt 5 Minuten bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und entsprechend den Versuchsbedingungen ausplattiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen erneut geerntet und ihre Fluoreszenz am FACS im FL1-Kanal vermessen.

2.8.11 Quantifizierung DNA-replizierender Zellen über BrdU-Einbau

Proliferierende Zellen bauen während der DNA-Synthese (S-Phase) zugesetzte, modifizierte Nukleotide (z.B. BrdU) ein. Das an Stelle von Thymin in wachsende DNA-Ketten eingebaute BrdU (Bromodeoxyuridin) kann mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden. BrdU markiert nur proliferierende Zellen, da arretierte Zellen keine DNA-Neusynthese betreiben und somit kein BrdU einbauen. Diese Nachweismethode kann mit anderen Anfärbungen, wie z.B. PI, kombiniert werden.

Durchführung:

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit BrdU ($60 \mu\text{M}$) für 1,5 Stunden inkubiert, anschließend geerntet und bei 500g für 3 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit 70%igen Ethanol für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit Waschpuffer (2.3.9) aufgefüllt, bei 500g 3 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in Denaturierungslösung (2.3.9) gelöst und gut durchmischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut gewaschen und das Pellet in $500 \mu\text{l}$

TrisHCl-Lösung (2.3.9) suspendiert. Die Probe wurde 2 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann erneut gewaschen. Daraufhin erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Antikörper gegen BrdU in 50 µl Verdünnungslösung (2.3.9). Nach Waschen der Probe und Inkubation mit Zweitantikörper (FITC-anti-Maus-Ig) in 50 µl Verdünnungslösung bei Raumtemperatur wurde nach einem weiteren Waschschrift die Probe in PI-Färbelösung (2.3.6) 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und schließlich im Zytometer vermessen.

2.8.12 Fluorometrische Analyse der Caspaseaktivitäten

Der Hauptanteil der proteolytischen Spaltungen während der Apoptose resultiert aus der Aktivierung der Caspasen. Die Enzyme dieser Familie erkennen spezifische Motive ihrer Substrate und spalten ausschließlich an der Carboxylseite eines Aspartatrestes (Alnemri et al. 1996).

Eine Aktivierung der Caspasen kann durch Zugabe eines synthetischen, an ein Fluorophor gekoppelten Substrates gemessen werden. Die Abspaltung des fluoreszierenden Substrates durch das aktive Enzym führt zur Erhöhung der Fluoreszenz, wobei das gebildete Fluorophor proportional der Konzentration an aktiver Caspase ist. Die Bestimmung von Caspaseaktivitäten erfolgt unter Verwendung von spezifischen Substraten für Caspase-3 (Ac-DEVD-AFC), Caspase-8 (Ac-IETD-AFC) und Caspase-9 (Ac-LEHD-AFC). Die Spaltung dieser Peptide durch die jeweilige Caspase führt zur Freisetzung von AFC (7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) welches bei einer Anregung von 405nm und Emission von 505nm im Fluorometer detektiert werden kann, da der blockierende Acetylrest (Ac) abgespalten wird (Stennicke & Salvesen 2000).

Durchführung:

Die zu untersuchenden Zellen wurden in Petrischalen ausgesät und je nach Fragestellung behandelt. Nach der Ernte wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gefäße wurden mit eiskaltem PBS aufgefüllt, bei 500g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml eiskaltem PBS gelöst. Diese Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und in der Tischzentrifuge bei 12000g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Proben in flüssigen Stickstoff schockgefroren, um sie dann bei -80°C einzulagern. Um die Caspaseaktivität zu bestimmen, wurden die aufgetauten Pellets in Lysispuffer gelöst, 10 Minuten auf Eis inkubiert, jeweils 50 µl Reaktionspuffer (2.3.10) zugegeben, in 3er Ansätzen auf eine 96-Loch-Platte verteilt und 1 µl des jeweiligen Substrates (1 mM) zu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C wurde die Platte im vorgeheizten Fluorometer bei ebenfalls 37°C für 2 Stunden vermessen.

2.9 Proteinchemische Methoden

2.9.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen (Gesamtzellextrakte)

Um Unterschiede in der Proteinexpression verschieden behandelter Zellen untersuchen zu können, werden die Zellen mit Hilfe eines Tris-Puffers in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren lysiert. Eine zusätzliche Ultraschallbehandlung führt zum Aufbrechen von Zellmembranen und zur mechanischen Zerkleinerung von Makromolekülen wie DNA oder RNA.

Durchführung:

Die in 10 cm Schalen ausplattierten Zellen wurden mitsamt Medium mithilfe eines Zellschabers geerntet und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 500g für 3 Minuten pelletiert, in PBS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Das gewaschene Zellpellet wurde in 400 µl Lysispuffer suspendiert (2.4.1). Nach kurzer Inkubation auf Eis (5 min) wurde jede Probe dreimal 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde das Zelllysate bei -80°C aufbewahrt.

2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Methode basiert auf der Farbreaktion der zu bestimmenden Proteine mit Coomassie-Brilliantblau, wobei Komplexe mit einem Absorptionsmaximum von 595 nm entstehen. Die ermittelte Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Der Farbstoff bindet in dieser Reaktion an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine.

Durchführung:

5 µl des zu messenden Proteinlysates wurden in eine Küvette vorgelegt und mit 995 µl Protein Färbelösung (2.4.7) vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Eichung mit einer BSA-Verdünnungsreihe vorgenommen.

2.9.3 Proteinauftrennung mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinmoleküle wandern in einem elektrischen Feld ihrer Größe und Nettoladung entsprechend. Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Solubilisierung von Proteinen verwendet. Dabei bilden einzelne Polypeptidketten einen Komplex

mit negativ geladenen SDS-Molekülen und wandern deshalb als einheitlich negativ geladener SDS-Proteinkomplex durch das Polyacrylamidgel. Um intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken aufzubrechen, wird ein Reduktionsmittel, z.B. β -Mercaptoethanol, zugegeben und für 3 Minuten gekocht. Die so vollständig denaturierten Proteine wandern mit einer ihrer Molekularmasse entsprechenden Geschwindigkeit.

Durchführung:

Die Proteingele wurden nach dem Protokoll von Laemmli (2.4.8) gegossen. Dazu wurde ein 12,5%iges Trenngel gegossen, mit Ethanol überschichtet und nach der Polymerisation mit H_2O abgespült. Daraufhin wurde das Sammelgel gegossen, und zur Ausbildung der Probenaschen wurde ein Kamm in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingesetzt. Nach der abgeschlossenen Polymerisierung wurde der Kamm entfernt, die Gelapparatur zusammengebaut und mit 1xSDS Laufpuffer (2.4.11) überschichtet. Die zuvor mit Probenpuffer (2.4.10) 1:1 versetzten und 3 Minuten bei $95^{\circ}C$ erhitzten Proben wurden nach kurzer Zentrifugation, zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile, in die Geltaschen aufgetragen. In der Regel wurden $5\ \mu g$ Protein verwendet. Zusätzlich wurden noch $5\ \mu g$ Proteinmarker aufgetragen. Zum Sammeln der Proteine im Sammelgel wurde eine Spannung von 80V angelegt, die später zur Auftrennung der Proteine auf 140V erhöht wurde. Nach erfolgreicher Auftrennung wurden die Proteine aus den Gelen durch Semi-Dry-Transfer auf PVDF-Membranen übertragen (2.9.4).

Zusätzlich wurden die Gele nach dem Transfer 30 Minuten mit Coomassiefärbelösung (2.4.14) gefärbt und danach in Entfärbelösung (2.4.15) inkubiert, um die restlichen, nicht transferierten Proteine für eine Ladekontrolle sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Zellophanpapiere gelegt und im Geltrockner 2-3 Stunden getrocknet.

2.9.4 Immunoblot-Analyse von Proteinen („Western Blot“)

Um ein bestimmtes, in der Elektrophorese aufgetrenntes Protein nachzuweisen, werden die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert und diese anschließend mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. Die Membranen binden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Um die Proteinbindungsstellen der Membran zu aktivieren, wird die Membran kurz in Methanol eingetaucht; der Transfer findet dann in der Blotkammer, einer Halbtrockenzelle, statt. Vor der Inkubation eines Blots mit Antikörpern werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit Blockmilch (2.4.16) abgesättigt.

Durchführung:

Zunächst wurden 2 x 3 Whatman 3MM Filterpapiere und die PVDF-Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Während die Filterpapiere und das Proteingel in Transferpuffer (2.4.13) äquilibrierten, wurde die Membran zur Aktivierung eine Minute in 100% Methanol eingetaucht. Nachdem beide Seiten der Blotkammer mit destilliertem Wasser befeuchtet waren, wurde auf der Kathodenseite ein „Gel-Sandwich“ aufgebaut. Hierzu wurden Gel und Membran zwischen zweimal 3 Lagen der in Transferpuffer getränkten Filterpapiere gelegt. Danach wurden mithilfe einer Pipette sämtliche Luftblasen aus dem Stapel entfernt, indem mit der Pipette vorsichtig über den Stapel gerollt wurde. Der Transfer erfolgte für zwei Stunden bei einer Stromstärke, die sich folgendermaßen errechnete: $\text{Stromstärke [mA]} = 0,8 \times \text{Fläche der Membran [cm}^2\text{]}$. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran nach abgelaufener Transferzeit mit dem Farbstoff Ponceau-Rot gefärbt, welcher die Proteinbanden reversibel sichtbar machte. Die Trichloressigsäure in der Färbelösung fixierte gleichzeitig die Proteine auf dem Blot. Die Farbe wurde mit H₂O wieder abgewaschen und verschwand vollständig beim einstündigen Blocken der Membran mit Blockmilch (2.4.16).

2.9.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Um ein bestimmtes, auf die Membran transferiertes Protein nachzuweisen, wird die Membran mit Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. Dies erlaubt eine gleichzeitige Größenbestimmung des erkannten Antigens. Ein gekoppelter zweiter Antikörper bindet spezifisch an den ersten, womit die Nachweisgrenze beträchtlich erhöht wird und auch schon geringe Mengen des Antigens aufgespürt werden können. Am Zweitantikörper ist das Enzym der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Es bewirkt nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid eine Chemilumineszenzreaktion, bei der Licht der Wellenlänge 428 nm freigesetzt wird (2.9.6).

Durchführung:

Die verwendeten Antikörper (Tab. 2.5) wurden in Blockmilch entsprechend der tabellarischen Auflistung verdünnt. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 30 bis 60 Minuten in Blockmilch geschwenkt und daraufhin mit Erstantikörperlösung über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Es wurde anschließend dreimal 10 Minuten mit frischer Blockmilch gewaschen, um überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurde eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert und wieder dreimal 10 Minuten mit Blockmilch gewaschen.

Antikörper gegen	Mono/poly	Klon	Ig	Spezie	Konzentration
Akt1	polyklonal	D17	-	Ziege	1:500
Aktin	polyklonal	C11	-	Ziege	1:1000
Bcl-x _L	monoklonal	2H12	IgG2a	Maus	1:1000
Caspase-3	polyklonal	H-277	-	Hase	1:1000
Caspase-8	monoklonal	C15	IgG2b	Maus	1:20
CD95	monoklonal	Apo 1-3	IgG3	Maus	1:1000
Cdc2	polyklonal	Ab-1	-	Hase	1:1000
cIAP2	polyklonal	-	-	Hase	1:1000
Cycline B	monoklonal	GNS-1	IgG1	Maus	1:500
Cycline D1	monoklonal	DCS-6	IgG2a	Maus	1:500
Cycline D3	monoklonal	G107-565	IgG1	Maus	1:500
Cycline E	monoklonal	HE12	IgG1	Maus	1:1000
Cytochrom c	monoklonal	7H8.2C12	IgG2b	Maus	1:1000
FADD	monoklonal	Klon 1	IgG1	Maus	1:500
c-FLIP	polyklonal	Dave-2	-	Hase	1:1000
Met	polyklonal	C28	-	Hase	1:1000
p21	monoklonal	F5	IgG2b	Maus	1:500
p27	monoklonal	F8	IgG1	Maus	1:500
p65	polyklonal	-	-	Hase	1:1000
P-Akt	polyklonal	(P-Ser473)	-	Hase	1:1000
PARP	monoklonal	4C10-5	IgG1	Maus	1:1000
Tubulin	monoklonal	DM1a	IgG1	Maus	1:1000

Tab. 2.5: Auflistung der verwendeten Antikörper zum immunochemischen Nachweis von Proteinen:

Die Antikörper (alle erkennen u.a. humane Antigene) wurden in Blotmilch wie angegeben verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Die Zweitantikörper anti-Maus-HRP und anti-Hase-HRP wurden 1:2000, anti-Ziege-HRP 1:7000 verdünnt eingesetzt.

2.9.6 Enhanced Chemolumineszenz (ECL) zur Sichtbarmachung von Antigen-Antikörper Komplexen

Das verwendete Reagenz besteht aus einer Luminollösung mit Lumineszenzverstärkern (Phenole) und einer Lösung mit Wasserstoffperoxid. Beide Lösungen werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Durch die Peroxidase des Zweitantikörpers wird das Substrat Luminol oxidiert, und es entsteht Licht mit einem Maximum von 428 nm. Dies kann durch die Exposition der Membran mit einem Autoradiographiefilm nachgewiesen werden.

Durchführung:

Die Membran wurde kurz in PBS eingetaucht, abgetropft und anschließend mit je 500 µl der zwei ECL-Detektionslösungen für exakt eine Minute gespült. Die Membran wurde auf einem Tuch abgetropft, in eine Klarsichthülle verpackt und in eine Filmkassette gelegt. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte

anschließend durch Auflegen eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer, wobei die optimale Expositionszeit zwischen 30 Sekunden und 45 Minuten betragen konnte.

2.9.7 Wiederverwendung von Western Blot-Membranen

Nach der Filmentwicklung können Erst- und Zweitantikörper durch Inkubation in Strip-Puffer (2.4.20) abgelöst werden. Nach erneutem Abblocken steht die Membran für eine weitere Erstantikörperinkubation zur Verfügung.

Durchführung:

Die noch mit ECL befeuchtete Membran wurde kurz in PBS getaucht, um die ECL-Lösung vollständig abzuspülen. Zu 25 ml des Strip-Puffers wurden 250 µl β -Mercaptoethanol zugegeben und die Membran darin für 30 Minuten im zuvor auf 56°C erhitzten Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Blockmilch gewaschen und schließlich mindestens 30 Minuten in Blockmilch inkubiert, bevor eine weitere Erstantikörper Inkubation über Nacht erfolgte.

2.9.8 Isolierung und Analyse des CD95-DISC

Zur Untersuchung der Proteine, die spezifisch mit dem aktivierten CD95-Rezeptor koimmunopräzipitieren, wurde eine DISC (Death-Inducing Signalling Complex)-Analyse durchgeführt (Scaffidi et al. 1999). Voraussetzung für die Aktivierung von CD95 ist die Vernetzung des Rezeptors entweder durch einen agonistischen Antikörper (anti-APO-1) oder durch seinen natürlichen Liganden CD95L. Die Bildung des DISC kann in TypI-Zellen schon nach wenigen Sekunden nachgewiesen werden, während in TypII-Zellen erst nach 30 Minuten eine DISC-Bildung nachweisbar wird (Scaffidi et al. 1998). Am DISC beteiligt sind u.a. die Moleküle FADD, Caspase-8 und FLIP. Die Rekrutierung der Caspase-8 resultiert in ihrer proteolytischen Spaltung. Die beiden p18 und p10 Fragmente werden in das Zytoplasma freigesetzt, bilden ein aktives Caspasetetramer und aktivieren andere Caspasen. Es wird in dieser Analyse mit Protein A-Sepharose Kügelchen präzipitiert, wobei neben Antigen und Antikörper noch an das Antigen gebundene Proteine mit isoliert werden. Das Prinzip der CD95-DISC-Analyse ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

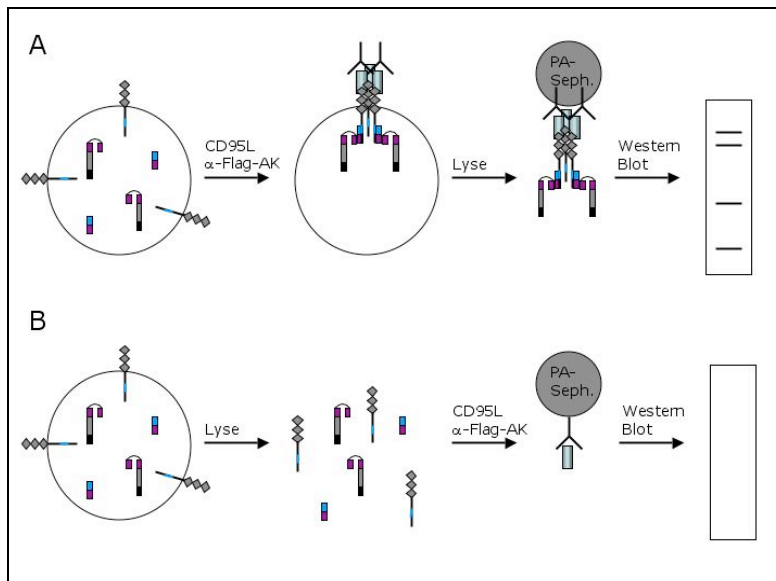


Abb. 2.3

DISC-IP

A: Zellen werden mit hCD95L und anti-Flag-AK stimuliert. Dies führt zu Rezeptor-Multimerisierung und Bindung intrazellulärer Signalmoleküle (u. a. FADD und Caspase-8). Nach der Zelllyse wird der Rezeptorkomplex mit Protein A-Sepharose (PA-Seph.) immunopräzipitiert und im Western Blot analysiert. **B:** Bei der Negativkontrolle werden Zellen erst lysiert und dann mit hCD95L und anti-Flag-AK inkubiert. Da es nicht zur Rezeptorkomplexbildung und Rekrutierung beteiligter Signalmoleküle kommt, werden diese auch nicht in der Western Blot-Analyse nachgewiesen.

Durchführung:

Zwei 15cm-Petrischalen mit jeweils 1×10^7 Zellen wurden mit 50 ng/ml hCD95L und 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Eine gleiche Anzahl an Zellen wurde als unstimulierter Kontrollansatz ebenfalls inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber gerntet und mit eiskaltem PBS gewaschen. Das nach Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 1 ml DISC-Lysispuffer resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde mit 14.000g bei 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Die Lysate der unbehandelten Kontrollzellen wurden mit hCD95L und anti-Flag-Antikörper versetzt. Beide Ansätze wurden in den darauf folgenden Schritten identisch behandelt. Zur Immunpräzipitation des Rezeptorkomplexes wurde jede Probe mit 50 µl Protein A-Sepharose 4B- Kügelchen, welche an die im Komplex enthaltenen anti-Flag-Antikörper binden, versetzt und 2 Stunden am Rotator bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit bindet der anti-Flag-Antikörper mit dem gesamten Komplex an die Kügelchen. Diese wurden anschließend fünfmal mit 1 ml DISC-Lysispuffer gewaschen und dabei mit 14.000g bei 4°C eine Minute zentrifugiert. Um die Sepharose-Kügelchen nach Dissoziation der Proteine zu entfernen, wurden die Proben mit SDS-Probepuffer (2.4.10) versetzt und 3 Minuten bei 95°C gekocht. Schließlich wurde jede Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und im anschließenden Western Blot-Verfahren (2.9.4) die Zusammensetzung des DISC-Komplexes durch Inkubation mit Antikörpern (Tab. 2.5) gegen Caspase-8 und FADD untersucht.

2.9.9 Fraktionierung in zytosolische und mitochondriale Fraktionen zur Erfassung der Cytochrom c - Freisetzung aus den Mitochondrien

In lebenden Zellen befindet sich Cytochrom c im mitochondrialen Intermembranraum und ist dort am Elektronentransport der Atmungskette beteiligt. In apoptotischen Zellen verändert Cytochrom c seine mitochondriale Lokalisation und akkumuliert im Zytoplasma, wo es an das Adaptor Protein Apaf-1 bindet. Dieses interagiert nach Oligomerisierung mit Proscaspase-9, die in diesem Komplex aktiviert wird und ihrerseits Effektorcaspasen aktiviert. Um die Cytochrom c - Translokation zu erfassen, werden Zellen durch Zentrifugation in ihre zytosolische und mitochondriale Fraktion aufgetrennt. In jeder Fraktion wird dann mittels Immunoblot der Gehalt an Cytochrom c bestimmt. Ein hoher Saccharosegehalt im Puffer gewährleistet, dass die Mitochondrien während der Homogenisierung intakt bleiben (Bossy-Wetzel & Green 2000).

Durchführung:

Die zu untersuchenden RKO-Zellen wurden in Gewebekulturschalen ausplattiert und entsprechend der Fragestellung behandelt. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgenommen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 200g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer A (2.4.5) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch 40 Auf- und Abbewegungen („Strokes“) im Glas-Homogenator (B-Typ, tight) wurden die Zellen vorsichtig aufgebrochen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um Kerne und nicht aufgebrochene Zellen zu entfernen, wurden die Proben bei 800g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Mitochondrien wurden in neuen Reaktionsgefäßen gesammelt und bei 22.000g 15 Minuten lang bei 4°C pelletiert. Der dabei anfallende Überstand enthielt die zytosolische Fraktion und wurde bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer B (2.4.6) gelöst, 20 Minuten auf Eis inkubiert und schließlich bei 22.000g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Gesamtheit löslicher mitochondrialer Proteine („mitochondriale Fraktion“) befand sich im Überstand und wurde ebenfalls bei -80°C eingefroren. Die beiden Fraktionen wurden im weiteren Verlauf durch SDS-PAGE aufgetrennt, um im Western Blot Verfahren den Gehalt an Cytochrom c zu bestimmen (2.9.4).

2.9.10 Nachweis von Zytokinen im Kulturüberstand (Zytokin-Array)

Mit dieser Methode können mehrere Zytokine simultan im konditionierten Medium einer Zellkultur nachgewiesen werden. Hierzu werden mit Antikörpern gegen eine Auswahl (je nach Array) von Zytokinen besetzte Membranen der Firma *Ray Biotech* benutzt, mit dem konditionierten Medium

inkubiert und wiederum mit einem Biotin-Antikörper-Cocktail versetzt. Anschließend werden die an die Antikörper gebundenen Cytokine mit Streptavidin und ECL-Reaktion detektiert (Huang et al. 2001).

Zytokin Array

A

Pos	Pos	Neg	Neg	ENA78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
Pos	Pos	Neg	Neg	ENA78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN- γ
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN- γ
MCP1	MCP2	MCP3	MCSF	MDC	MIG	MIP1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
MCP1	MCP2	MCP3	MCSF	MDC	MIG	MIP1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
TNF α	TNF β	EGF	IGF-1	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGF B	Leptin	Neg	Pos
TNF α	TNF β	EGF	IGF-1	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGF B	Leptin	Neg	Pos

B

Pos	Pos	Neg	Neg	BDNF	BLC	CK β 8-1	Eotaxin	Eotax2	Eotax3	FGF-4	FGF-6
Pos	Pos	Neg	Neg	BDNF	BLC	CK β 8-1	Eotaxin	Eotax2	Eotax3	FGF-4	FGF-6
FGF-7	FGF-9	Fit-3L	Fracta.	GCP2	GDNF	HGF	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IL16
FGF-7	FGF-9	Fit-3L	Fracta.	GCP2	GDNF	HGF	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IL16
IP10	LIF	LIGHT	MCP4	MIF	MIP3 α	NAP2	NT-3	NT-4	Osteop	PARC	PIGF
IP10	LIF	LIGHT	MCP4	MIF	MIP3 α	NAP2	NT-3	NT-4	Osteop	PARC	PIGF
TGF β 2	TGF β 3	TIMP1	TIMP2	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos
TGF β 2	TGF β 3	TIMP1	TIMP2	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos

Abb. 2.4 Zytokin-Arrays der Firma Ray Biotech

A: Antikörper Positionen (doppelter Ansatz) des Arrays Nr. III

B: Antikörper Positionen (doppelter Ansatz) des Arrays Nr. IV. Pos: Positivkontrolle. Neg: Negativkontrolle.

Durchführung:

Es wurden die humanen Zytokin-Arrays der Firma Ray Biotech benutzt sowie die im Kit enthaltenen Puffer und Lösungen. Die Membran wurde mit 2 ml Blockpuffer versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sorgfältiger Abnahme des Puffers wurde die Membran mit dem zu untersuchenden konditionierten Medium für 1h 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dreimal mit Waschpuffer 1 und anschließend zweimal mit Waschpuffer 2 gewaschen und daraufhin mit 1 ml biotinkonjugierten Antikörper-Cocktail in Blockpuffer für 1h 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde mehrfach mit Waschpuffer 1 und 2 gewaschen, um dann die Membran mit 2 ml HRP-konjugiertem Streptavidin in Blockpuffer versetzt 45 Minuten inkubieren zu lassen. Danach

wurde mehrfach mit Waschpuffer 1 und 2 gewaschen und schließlich gebundene Zytokine mithilfe der ECL-Reaktion nachgewiesen.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Bakterien-Transformation durch „Hitzeschock“

Bei der Transformation werden freie DNA-Moleküle durch Hitzeschock in chemisch kompetente Bakterien eingeschleust. Die Bakterien werden auf Anwesenheit des transformierten Plasmids hin selektioniert (Hanahan 1983).

Durchführung:

Zur Transformation wurden 100 µl der tiefgefrorenen chemokompetenten Bakterien (DH5α) auf Eis aufgetaut, die Plasmid-DNA zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 90 Sekunden auf 42°C erwärmt („Hitzeschock“) und dann 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die transformierten Bakterien auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert, bis einzelne Kolonien sichtbar wurden.

2.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Abtrennung der Plasmid-DNA vom Rest der Zellkomponenten, einschließlich der chromosomalen bakteriellen DNA, werden die Bakterien lysiert und die Lysate über Anionenaustauschersäulen gegeben.

Durchführung:

Um große Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das Maxi-Plasmid-Reinigungsprotokoll von der Firma *Qiagen* verwendet. 250 ml einer „über Nacht Bakterienkultur“ in ampicillinhaltigem LB-Medium wurden abzentrifugiert (15 min, 2200g, 4°C), in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer P2 vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eiskalter Puffer P3 (10 ml) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12000g, 45 min, 4°C) wurde der Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben, die anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen wurde. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml des Puffers QF von der Säule eluiert. Das in 50ml-Reaktionsgefäßen gesammelte Eluat wurde zur DNA-Fällung mit 10,5 ml Isopropanol vermischt, dann zentrifugiert

(2000g, 30 min, 4°C), mit 70%igem Ethanol gewaschen und das Pellet getrocknet und in 200 µl H₂O gelöst.

2.10.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um mit der vorgesehenen Menge an DNA oder RNA weiter arbeiten zu können, wird die Probe zuvor auf den Nukleinsäure-Gehalt überprüft. Die Bestimmung erfolgt über eine photometrische Messung. Da Nukleinsäuren Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, werden die Proben bei dieser Wellenlänge gegen den entsprechenden Leerwert in Quarzküvetten gemessen. 1 OD₂₆₀ entsprechen 40 µg Gesamt-RNA/ml bzw. 50 µg Gesamt-DNA/ml, so kann unter Berücksichtigung der Verdünnung für jede Probe die Nukleinsäurekonzentration berechnet werden. VF: Verdünnungsfaktor.

Für die Berechnung wurden folgende Formeln verwendet:

Konzentration einer Lösung mit DNA: $OD_{260} \times VF \times 50 = \text{DNA-Konz} [\mu\text{g DNA/ml}]$

Konzentration einer Lösung mit RNA: $OD_{260} \times VF \times 40 = \text{RNA-Konz} [\mu\text{g RNA/ml}]$

Durchführung:

Um die Nukleinsäurekonzentration der Probe zu bestimmen, wurden 5 µl der Probe mit 495 µl sterilem Wasser versetzt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen den Leerwert (500 µl H₂O) gemessen.

Die Konzentration wurde anhand der gemessenen Extinktion berechnet.

2.10.4 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonucleasen sind besondere DNasen, die eine kurze Folge von 4 bis 8 Nucleotidpaaren erkennen. Sie hydrolysieren DNA entweder direkt an solchen Erkennungssequenzen oder wenige Basenpaare davon entfernt. Somit ermöglichen Restriktionsendonucleasen die Spaltung langer DNA-Moleküle in definierte kürzere Fragmente. Die Enzyme benötigen dafür in der Regel Magnesium-Salze als Kofaktoren, die in den speziellen Reaktionspuffern enthalten sind.

Durchführung:

Je nach Restriktionsenzym wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durch 10-fache Verdünnung der entsprechenden konzentrierten Reaktionspuffer eingestellt. Die Restriktionsspaltung erfolgte in 30 µl Gesamtvolumen, wobei 1 µg DNA mit 1-5 U Restriktionsenzym 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Vor der Agarosegelelektrophorese wurde dem Restriktionsansatz 1/6 Volumen des entsprechend konzentrierten Probenpuffers hinzugefügt.

2.10.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der DNA-Fragmente wird die DNA-Probe je nach Fragment auf ein 1-2%iges Agarosegel aufgetragen. Da die Nukleinsäuren durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld und können in der Agarosematrix ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Die zum Restriktionsverdau benutzten Enzyme liefern Fragmente definierter Größe, welche nach Auftrennung mittels UV-Licht identifiziert werden können, denn unter UV-Licht fluoresziert das zugegebene und in die DNA interkalierte Ethidiumbromid.

Durchführung:

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde 1 g Agarose mit 100 ml 0,5xTBE-Puffer (2.5.1) vermischt und zum vollständigen Lösen kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen der Agarose wurde 1 µl Ethidiumbromid zupipettiert und die Agaroselösung in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Nach dem Transfer des Gels in die Elektrophoresekammer und dem Auffüllen der Kammer mit TBE-Puffer wurden jeweils 30 µl DNA-Probe mit 6 µl Probenpuffer (2.5.3) versetzt und in die Probenaschen aufgetragen. Zur Analyse von RNA-Proben war ein RNA-Probenpuffer (2.5.4) nötig. Zusätzlich wurde ein Größenmarker mit auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Probenauftrennung erfolgte bei 80V für ca. 45 Minuten. Anschließend konnten die auf dem UV-Schirm sichtbaren Banden identifiziert und ausgewertet werden.

2.10.6 Klenow – „Fill in“-Reaktion zur Herstellung von DNA-„Blunt ends“

Um aus DNA-Überhängen „blunt-ends“ herzustellen und somit z.B. ein „Insert“ in einen Vektor einschleusen zu können, der mit anderen Restriktionsendonukleasen geschnitten worden ist als das „Insert“, werden mit der Klenow-Polymerase die DNA-Überhänge aufgefüllt.

Durchführung:

Die Klenow-Reaktion wurde speziell zur Klonierung eines sog. „All-in-one“-Konstruktes für die retrovirale Transduktion benötigt. Jeweils 30 µl des mit ClaI geschnittenen Vektors und des mit Xba geschnittenen „Insert“-Verdaus (p27-Flag) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurden 1 µl dNTPs (5 mM), 1 µl Klenow-Enzym, 3 µl EcoPol Puffer und 25 µl H₂O zugegeben. Nun wurde 15 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend die Reaktion mit Hilfe einer Hitzeinaktivierung gestoppt, d.h. jeder Ansatz wurde für 20 Minuten auf 75°C erwärmt (irreversible Denaturierung und Inaktivierung der Enzyme). Nach kurzem Abzentrifugieren wurde dann der nächste Restriktionsverdau durchgeführt.

2.10.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen (QIAEX II) und DNA-Fällung

Um DNA aus Agarosegelen zu extrahieren und aufzureinigen, wurde das QIAEX II Kit von *Qiagen* benutzt. Dabei werden alle Nicht-Nukleinsäure-Bestandteile wie Agarose, Proteine, Salze und Ethidiumbromid während der Waschschriffe entfernt. Die Funktionsweise des Kits basiert auf einer selektiven und quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren an die Qiaex Silica-Gel-Partikel in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die chaotropen Salze in Puffer QX1 zerstören Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zuckern im Agarosepolymer und führen somit zur Auflösung der Gelstücke. Eine hohe Salzkonzentration bedingt auch die Dissoziation DNA-bindender Proteine von den DNA-Fragmenten. Die aufgereinigte DNA wird anschließend in H₂O gelöst.

Durchführung:

Die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen Stückchen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml Puffer QX1 versetzt. Nach Zugabe von 20 µl QIAEX II (Silica-Gel-Partikel) wurde jede Probe gut durchmischt und 10 Minuten bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde 1 Minute bei 12.000g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, 500 µl Puffer QX1 zugegeben und gut durchmischt. Es wurde zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet zweimal mit 500 µl Puffer PE gewaschen. Nach einer Trocknungszeit von ungefähr 15 Minuten wurde die DNA in 20 µl H₂O gelöst, gemischt und nach einer Inkubation von 10 Minuten für 1 Minute bei 12.000g zentrifugiert. Der DNA-enhaltende Überstand eines Ansatzes wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Um das Volumen für die anschließende Ligation zu reduzieren, wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Hierzu wurden das dreifache Volumen an Ethanol, 20 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2; Gebrauchskonzentration: 0,3M) und 1 µl Glycogen zugegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde die Probe 30 Minuten lang mit 13.000g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das DNA-Pellet getrocknet und schließlich in 50 µl H₂O aufgenommen. Zur Quantifizierung und Qualitätsabschätzung wurden 3 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.10.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter der Ligation von DNA-Fragmenten wird die Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle durch die Bildung neuer Phosphodiesterbindungen verstanden. Dabei katalysieren DNA-Ligasen die Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH Gruppe am anderen DNA-Ende unter Wasserabspaltung.

Durchführung:

Plasmid-Vektor und „Insert“ wurden in den Verhältnissen 1:3 gemischt und Ligase sowie Reaktionspuffer zugegeben. Zusätzlich wurden zwei Kontrollansätze vorbereitet: zum einen wurden Vektor und Ligase mit Puffer und H₂O vermischt und in einem weiteren Ansatz wurde ausschließlich Vektor in Puffer und H₂O gemischt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Für die darauf folgende Transformation wurde ein halber Ligationsansatz in 50 µl kompetenten Bakterienzellen (z.B. DH5α) eingesetzt.

2.10.9 Sequenzanalyse

Die zu sequenzierende DNA wird mit einer DNA-Polymerase und kurzen Primern, die den Replikationsstart ermöglichen inkubiert. Die im Reaktionsansatz ebenfalls enthaltenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTP's) werden von der Polymerase als Bausteine zur DNA-Synthese verwendet und führen wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe zur Beendigung der Replikation. Während der Sequenzierreaktion entsteht dadurch für jede Nukleotidposition eine durch die Fluoreszenzmarkierung detektierbare Konzentration an DNA-Fragmenten.

Durchführung:

Jeweils 1 µl der jeweiligen Primer (10 pmol/µl) wurde mit 0,5 µg Plasmid-DNA in 7 µl H₂O gemischt und zur Sequenzierung in einem ABI377-Sequenzierautomaten zum Instituts-Service gegeben.

Benutzte Sequenzier-Primer (2.5.6): p27-3'V, p27-5'V, All-5', All-3'.

2.10.10 Präparation und Sichtbarmachung genomischer DNA aus apoptotischen Zellen („DNA-Leiter“)

Während der Apoptose kommt es zu einem Abbau der genomischen DNA, wobei zunächst 50 – 300 kbp Fragmenten gebildet werden, bevor niedermolekulare Fragmente entstehen (Kaufmann et al. 2000). Diese niedermolekularen Fragmente sind Vielfache eines 180bp Fragmentes, das entsteht, wenn die apoptosespezifische Endonuklease CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease) zwischen den Nukleosomen in der Linkerregion die DNA hydrolysiert. Diese DNA-Fragmente können in einem Agarosegel aufgetrennt werden und zeigen ein charakteristisches Leiter-Muster. Die DNA nekrotischer Zellen dagegen erscheint als Schmier auf dem Agarosegel, da sie unspezifisch und stochastisch verdaut wird (Wyllie et al. 1980, Kaufmann et al. 2000).

Durchführung:

Die zu untersuchende Zellprobe wurde geerntet, bei 500g für 3 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in 500 µl DNA-Extraktionspuffer (2.5.13) resuspendiert und über Nacht bei 50°C inkubiert. Daraufhin wurde jede Probe mit RNase A (10 ng/µl) 1 Stunde bei 37°C verdaut und anschließend die DNA gefällt. Hierzu wurde 500 µl Phenol/Chloroform zugegeben und 15 Minuten durch langsame Rotation am Rad durchmischt. Die Probe wurde dann 5 Minuten bei 12.000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 500 µl Isopropanol zugegeben und zum Ausfällen der DNA geschüttelt. Dann wurde 10 Minuten mit 12.000g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet getrocknet und schließlich in 100 µl H₂O gelöst. Zur Analyse wurde die DNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.10.11 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Isolation der Gesamt-RNA werden die Zellen lysiert und danach die Nukleinsäuren und Proteine über die unterschiedliche Löslichkeit in saurem Phenol getrennt. Nach der Extraktion liegen die DNA in der Phenol-Phase, die denaturierten Proteine in der Interphase und die RNA in der wässrigen Oberphase gelöst vor (Chomczynski & Sacchi 1987).

Durchführung:

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden RKO-Zellen von jeweils zwei 10 cm-Gewebekulturschalen pro Ansatz verwendet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 3 ml „Triazol“ von der Firma *Sigma* pro Schale lysiert. Mehrmaliges Aufziehen mit der Glaspipette stellte ausreichende Homogenität des Lysats sicher, das dann in jeweils ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten stehen gelassen wurde. Anschließend wurde 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Triazol zugegeben, wobei die Probe ca. 15 Sekunden lang geschüttelt wurde. Zur Phasentrennung wurden die Proben erst 2-3 Minuten abgestellt und dann 15 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert.

Die wässrige Oberphase, in der sich die RNA befindet, wurde sorgfältig abgenommen, in ein frisches 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Triazol versetzt. Die RNA-Fällung erfolgte über Nacht bei 4°C; anschließend wurde mit 12.000g für 10 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Schließlich wurde die als Pellet vorliegende RNA mit 1 ml 75% Ethanol pro 1 ml Triazol gewaschen und dann mit 7.500g bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Um eine möglichst reine RNA zu

erhalten, wurde dieser Waschschrift wiederholt. Der Ethanolüberstand wurde vollständig abgenommen und verworfen, das gewaschene RNA-Pellet getrocknet und schließlich in 100 µl DEPC-Wasser gelöst.

2.10.12 DNA-Microarray

DNA-Microarrays erlauben die gleichzeitige Analyse des RNA-Expressionsniveau sämtlicher bekannter Gene (RNA- oder Expressionsprofiling). Die DNA-Array-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren („Watson-Crick-Base-Pairing“). Auf einem Trägersubstrat (Glasscheibe oder Nylon/Nitrocellulose-Membranen) strukturiert immobilisierte DNA hybridisiert mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Targetnukleinsäuren aus verschiedenen zu vergleichenden Proben. Die Orte und die Intensität der Target-Hybridisierungen werden nach Abwaschen unspezifisch gebundener Targets über Fluoreszenzanalyse erfasst. Für Expressionsanalysen werden spezifische vom 3'-Ende der mRNA abgeleitete cDNA-Proben oder direkt aus Datenbanksequenzen abgeleitete Oligo-Proben als DNA-Proben verwendet. Diese werden auf dem Array mit Targets aus zwei verschiedenen fluoreszenzmarkierten revers transkribierten cDNAs hybridisiert. Genexpressions-Muster werden nach Hybridisierung über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den verschiedenen Wellenlängen für die beiden Proben erstellt (Young 2000).

Durchführung:

Die Durchführung sowie eine erste Analyse der *Affymetrix* HG-U133A und HG-95A Chips erfolgten im Labor von Prof. Tarik Möroy im Universitätsklinikum Essen (PD Ludger Klein-Hitpass). Weitere Auswertungen wurden mit Hilfe der *Microsoft Excel* und *GeneSpring* Software durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen in Zellen mit ecdyson-induzierbarem Genexpressionsystem für die Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27

3.1.1 Das ecdysoninduzierbare System

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Apoptose untersucht werden. Hierzu wurden von Dr. M. Schmidt (*ASTA Medica*, Frankfurt) generierte RKO-Zelllinien mit induzierbarer p21-(RKO_{p21}) oder p27-(RKO_{p27}) Genexpression benutzt (Schmidt et al. 2000). Das Prinzip des ecdysoninduzierbaren Genexpressionssystems beruht auf der Heterodimerisierung der Hormonrezeptoren RXR und VgEcR (modifizierter Ecdysonrezeptor) und anschließender Transkription der eingebrachten Gensequenz nach Zugabe eines Insektenhormons aus der Ecdyson-Familie. Die Vorteile dieses Systems bestehen darin, dass die Expression des zu untersuchenden Genprodukts nach Bedarf angeschaltet werden kann und dass Insektenhormone im Allgemeinen keinen Einfluss auf Säugerzellen haben (Saez et al. 2000).

Das Auslösen des in die Zellen aufgenommenen Systems durch Zugabe eines Ecdysonhomologs führte zu einer starken Expression des CDK-Inhibitors p21 bzw. des CDK-Inhibitors p27, was sich in der Western Blot Analyse zeigte (Abb. 3.1 A). Hierfür wurden die Zellen 48 Stunden nach Zugabe von Muristeron (3 μ M) lysiert und anschließend analysiert. Im nicht induzierten Zustand, d.h. ohne Zugabe von Muristeron, war die endogene Menge der Proteine als schwache Bande erkennbar, nach Induktion hingegen zeigte das deutlich stärkere Signal die induzierte Überexpression der Proteine an (Abb. 3.1; bei gleicher Gelbeladung; Daten nicht gezeigt).

Um die Zellzyklusverteilung der induzierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu erfassen, wurde eine DNA-Anfärbung der fixierten und permeabilisierten Zellen mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Die anschließende Vermessung im Durchflußzytometer zeigte, dass die Überexpression der CDK-Inhibitoren erwartungsgemäß in einem Wachstumstop der normalerweise stark proliferierenden RKO-Zellen resultierte (Abb. 3.1 B). Während sich p27-überexprimierende Zellen fast vollständig in der G₀/G₁-Phase sammelten (91%), arretierte ein kleiner Teil (5%) der p21-überexprimierenden Zellen auch zusätzlich in der G₂/M-Phase. Dies kann daran liegen, dass p21 auch G₂/M-Phase spezifische CDK/Cyclin-Komplexe hemmt (Baus et al. 2003). Die Vermessung unbehandelter, proliferierender RKO-Zellpopulationen ergab, dass sich hier im Mittel $45 \pm 5\%$ in der G₀/G₁-Phase und jeweils $25 \pm$

5% in der S- und G2/M-Phase des Zellzyklus befanden (Abb. 3.1). Apoptotische Zellen erschienen aufgrund ihrer fragmentierten und aus dem Kern diffundierten DNA im subG1-Bereich. Induzierte RKOp21-Zellen wiesen einen Anteil von ca. 5% in diesem Bereich auf, bei RKO- und induzierten RKOp27-Zellen wurden indessen ca. 2% apoptotische Zellen gemessen.

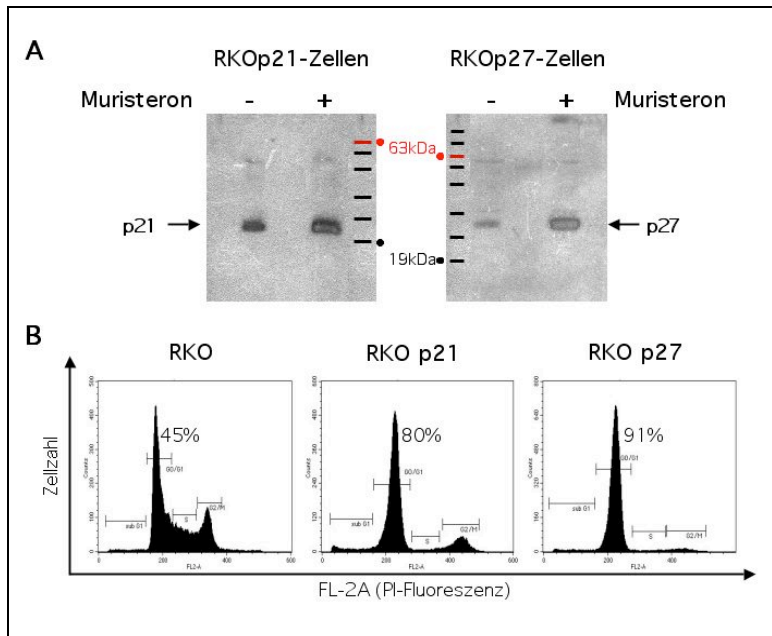


Abb. 3.1

Induzierte Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 in RKO-Zellen nach Muristeronbehandlung führt zu einem G0/G1-Zellzyklusarrest

A: Durch Zugabe von Muristeron ($3 \mu\text{M}$) zum Zellkulturmedium wurde die Expression der CDK-Inhibitoren p21 bzw. p27 in den von Dr. M. Schmidt erhaltenen RKO-Zellen induziert. Dies war 48h nach Behandlung anhand der erhöhten Proteinmenge im Western Blot nachweisbar. Dazu wurden die Blotmembranen mit spezifischen Antikörpern gegen p21 bzw. p27 inkubiert. **B:** Proliferierende RKO-Wildtypzellen sowie zur p21- bzw. p27- Expression induzierte RKO-Zellen wurden für die Zellzyklusanalyse mit Ethanol fixiert und die DNA der Zellen mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Eine Überexpression der CDK-Inhibitoren führte zum Zellzyklusarrest der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (p21: 80%; p27: 91%).

Ein Vergleich zwischen den natürlich vorkommenden Ecdysonhomologen Muristeron und Ponasteron, sowie dem synthetisch hergestellten GS-E zeigte, dass Muristeron am effektivsten durch eine sehr hohe induzierte p27-Expression die Zellzyklusmaschinerie zum Anhalten brachte (Tabelle 3.1). Daher wurde für die weiteren Experimente kontinuierlich Muristeron in einer Endkonzentration von $3 \mu\text{M}$ zur Induktion benutzt.

Induktor	G0/G1	STABW	n
unbehandelt	46,6 %	2,1	9
Muristeron A ($3 \mu\text{M}$)	90,1 %	4,2	15
Ponasteron A ($3 \mu\text{M}$)	72,3 %	8,8	9
GS-E ($3 \mu\text{M}$)	52,5 %	-	1
GS-E ($9 \mu\text{M}$)	89,5 %	-	1

Tab. 3.1: Vergleich der Induktoren für das Ecdysonsysteem

Im nicht-induzierten Zustand befanden sich $46,6 \pm 2,1\%$ der RKO-Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Durch Zugabe der Induktoren kam es zum Zellzyklusarrest, wobei mit Muristeron nach 48h $90,1 \pm 4,2\%$ der Zellen in G0/G1 arretierten, mit Ponasteron $72,3 \pm 8,8\%$ und mit GS-E nur $52,5\%$ der Zellen. Mit höherer GS-E Konzentration konnte das jedoch auf $89,5\%$ der Zellen in der G0/G1-Phase gesteigert werden. In nachfolgenden Experimenten wurde daher Muristeron in der Endkonzentration von $3 \mu\text{M}$ zur Induktion des Genexpressionssystems verwendet. STABW: Standardabweichung, n: Anzahl der Experimente.

3.1.2 Apoptoseverhalten der CDK-Inhibitor-überexprimierenden Zellen

Die Induktion des ecdysoninduzierbaren Genexpressionsystems in RKOp21- und RKOp27-Zellen führte zur Überproduktion von p21 bzw. p27 und damit zu einem G0/G1- Zellzyklusarrest, ohne dabei jedoch Apoptose auszulösen. Daraufhin sollte das Apoptoseverhalten der in der G0/G1-Phase arretierten Zellen nach Zugabe von apoptoseinduzierenden Substanzen untersucht werden. Zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für spätere Experimente wurden verschiedene Konzentrationen des Todesrezeptorliganden hCD95L zu den RKO-Zellen zugegeben. Dabei wurden Apoptoseraten von ca. 30% mit 10 ng/ml an rekombinanten humanen CD95 Ligand (hCD95L), von ca. 50% mit 20 ng/ml und danach ein verlangsamer Anstieg von ca. 50% auf ca. 60% mit den Konzentrationen 30 ng/ml und 60 ng/ml gemessen (Abb. 3.2 A). Im Folgenden wurde mit einer Konzentration von 10 ng/ml gearbeitet, da bei einer Apoptoserate von 30% sowohl ein anti-apoptotischer Effekt als auch ein pro-apoptotischer Effekt, mit verminderter bzw. erhöhter Apoptoserate, nachweisbar bleibt. Es wurde stets neben dem CD95 Liganden eine konstante Menge an Cycloheximid (100 ng/ml) und anti-Flag-Antikörper (1 µg/ml) zugegeben. Cycloheximid (CHX) wurde verwendet, um die TypII RKO-Zellen (vgl. 1.1.3.3) gegenüber der todesrezeptorvermittelten Apoptose zu sensitivieren. Der anti-Flag-Antikörper wurde zur Vernetzung der Flag-fusionierten hCD95L-Moleküle und damit für eine verbesserte Aktivierung des CD95 Rezeptors benötigt.

Darüber hinaus wurde eine Zeitkinetik durchgeführt, die ergab, dass bereits nach vier Stunden Inkubation mit 10 ng/ml hCD95L (plus CHX und anti-Flag-Antikörper) ca. 35% der Zellen im subG1-Bereich (= apoptotische Zellen) im sog. „Nicoletti“-Nachweis (PI Anfärbung ethanolfixierter Zellen) der untersuchten Zellpopulation detektierbar waren. Dieser Wert stieg nach 6 Stunden auf ca. 60% an und fiel nach 24 Stunden wieder auf ca. 35% ab (Abb. 3.2 B). Da sich für die Induktion mit Muristeron eine Inkubationsdauer von 48 Stunden als optimal erwiesen hatte (Abb. 3.1A), wurde als Apoptosestimulus rekombinantes hCD95L oder TRAIL 24 Stunden nach Muristeronstimulation für weitere 24 Stunden zugegeben, bevor der Anteil toter Zellen quantifiziert wurde.

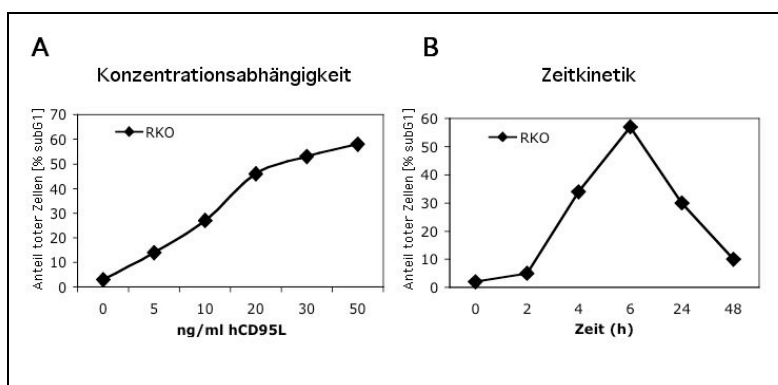


Abb. 3.2:
hCD95L-induzierte Apoptose

Eine Untersuchung unterschiedlicher hCD95L Konzentrationen (A) sowie eine Zeitkinetik der hCD95L-induzierten Apoptose (B) ergaben folgende optimale Bedingungen für die Apoptosestimulation in RKO-Zellen: 10ng/ml hCD95L, 100 ng/ml CHX und 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper für maximal 24h. Es wurde der Gehalt an Ereignissen im subG1-Bereich nach PI- Anfärbung der DNA ethanolfixierter Zellen im Durchflußzytometer bestimmt.

Wurden löslicher CD95 Ligand oder TRAIL im nächsten Schritt zu induzierten RKOp21- oder RKOp27-Zellen zugegeben, um Apoptose auszulösen, starben wesentlich weniger der zellzyklusarretierten Zellen im Vergleich zu der proliferierenden Kontrollpopulation. Demnach waren die RKO-Zellen mit induzierter p21 bzw. p27 Überexpression gegenüber der todesrezeptorvermittelten Apoptosekaskade geschützt (Abb. 3.3). Da die p27-Überexpression zu einem höheren Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase und einem stärkeren Protektionseffekt gegenüber todesligandinduzierter Apoptose führte als bei p21-überexprimierenden Zellen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit induzierbaren RKOp27-Zellen gearbeitet, um die Zellzyklusabhängigkeit CD95L-induzierter Apoptose zu untersuchen. Das zugegebene Cycloheximid wirkte in der eingesetzten Konzentration von 100 ng/ml alleine nicht toxisch (Abb. 3.3).

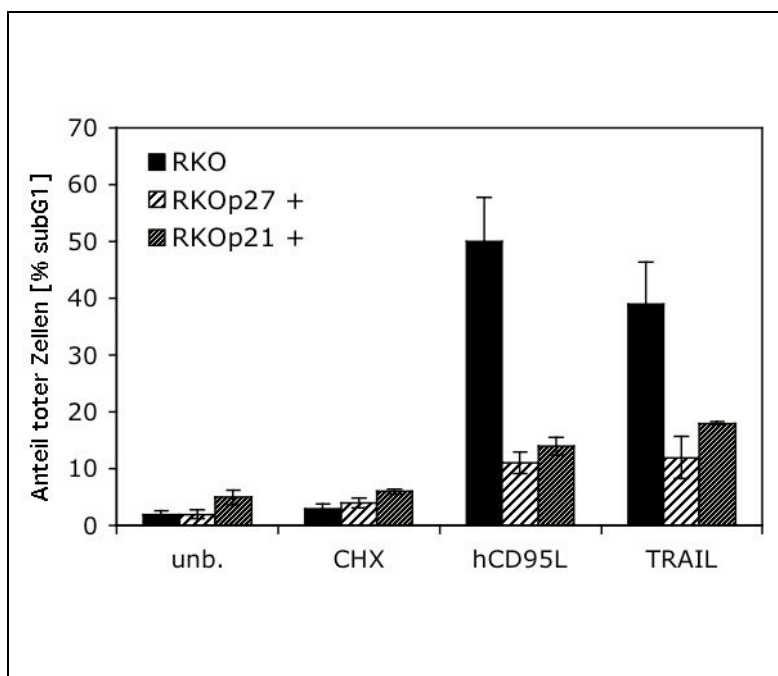


Abb. 3.3

Hemmung der hCD95L- bzw. TRAIL-induzierten Apoptose in RKOp21- und RKOp27-Zellen

Zur p21- bzw. p27-Überexpression induzierte RKOp21 (+) bzw. RKOp27 (+) Zellen reagierten nur schwach auf die durch hCD95L oder TRAIL ausgelösten Apoptosesignale. Untersucht wurden unbehandelte RKO-Zellen (unb.), Zellen, die mit 100 ng/ml Cycloheximid (CHX) alleine oder mit 10 ng/ml hCD95L, 100 ng/ml Cycloheximid und 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper (hCD95L), oder mit 10 ng/ml rekombinanten TRAIL plus CHX (TRAIL) für 24 Stunden inkubiert wurden. Dabei wurden RKOp21- und RKOp27-Zellen mit 3 µM Muristeron induziert (+) und nach 24h für weitere 24h mit Todesliganden behandelt. RKO-Kontrollzellen wurden 24h unbehandelt gelassen und anschließend ebenfalls für weitere 24h mit apoptoseauslösenden Substanzen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob die Protektion der induzierten RKOp27-Zellen auch während der Inkubation mit hohen hCD95L-Konzentrationen bestehen blieb, wurden im Folgenden hCD95L-Konzentrationen von 1,0 ng/ml bis 60 ng/ml getestet (Abb. 3.4 A). Während RKO-Zellen durch Zugabe höherer hCD95L-Konzentrationen vermehrt starben, blieben induzierte RKOp27-Zellen geschützt. Bei 60 ng/ml an hCD95L ließ der Protektionseffekt der p27-Expression in absoluten Zahlen nach, blieb aber im Vergleich zu den Kontrollzellen bestehen. Am deutlichsten zeigte sich die Blockade der CD95-vermittelten Apoptose in induzierten RKOp27-Zellen bei einer hCD95L-Konzentration von 20 ng/ml: Hier starben ca. 45% der proliferierenden RKO-Zellen, aber nur ca. 7% (ca. 1/6) der p27-überexprimierenden Zellen (Abb. 3.4 A).

Um einen weiteren todesrezeptorvermittelten Apoptosesignalweg zu untersuchen, wurde TRAIL in ansteigenden Konzentrationen zu RKO- und induzierten RKOp27-Zellen gegeben (Abb. 3.4 B). Es zeigte sich, dass der Protektionseffekt der arretierten RKOp27-Zellen auch bei hoher TRAIL-Konzentration bestehen blieb. Nur 10% der induzierten RKOp27-Zellen waren apoptotisch im Vergleich zu 40% der Kontrollzellen. Wurden die Zellen mit 60 ng/ml TRAIL ohne Cycloheximid behandelt, um einen Einfluss des Proteinsynthesehemmers auf die RKOp27-Zellen auszuschließen, verminderte sich zwar die Gesamtzahl apoptotischer Zellen, aber der Protektionseffekt blieb deutlich bestehen (Abb. 3.4 B *). Während bei einer Behandlung mit 60 ng/ml TRAIL plus Cycloheximid 40% tote Kontrollzellen im Vergleich zu 10% apoptotischen p27-exprimierenden Zellen gemessen wurden, verringerte sich diese Prozentzahl auf 15% tote RKO-Zellen bzw. 3% apoptotische RKOp27-Zellen, wenn kein CHX verwendet wurde. Dies bedeutet, dass sowohl mit als auch ohne Cycloheximid-Sensitivierung 4- bis 5-mal mehr proliferierende als zellzyklusarretierte RKO-Zellen durch todesrezeptorinduzierte Apoptose starben.

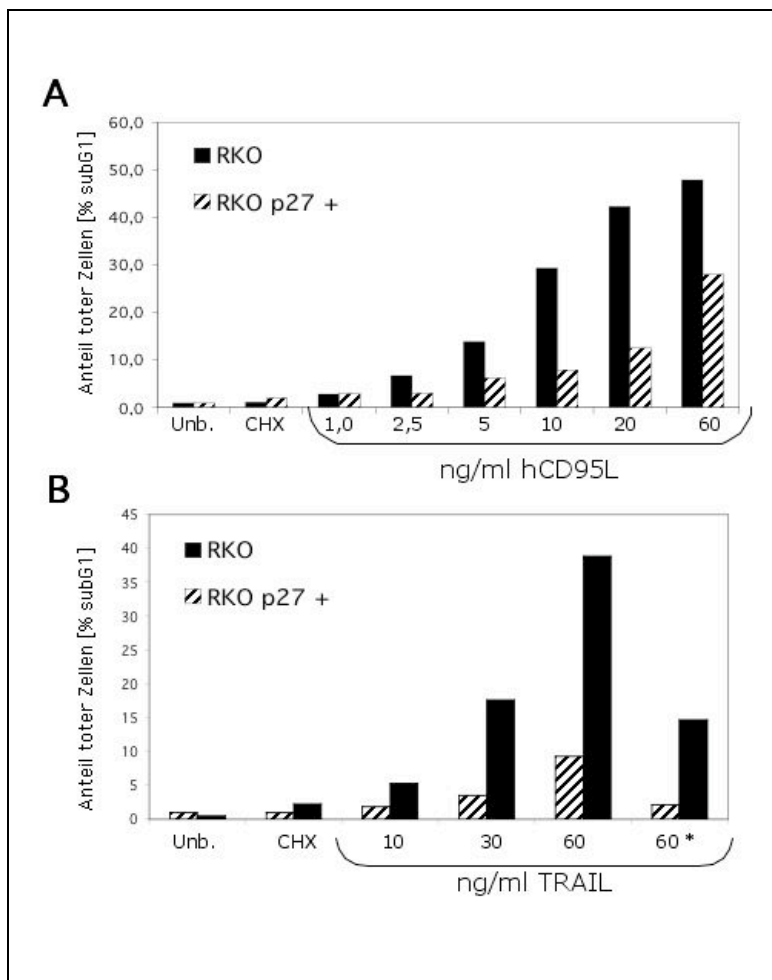


Abb. 3.4:

Überexpression von p27 schützt RKO-Zellen vor CD95-induzierter Apoptose

A: hCD95L wurde für 24h in den Konzentrationen 1, 2.5, 5, 10, 20 und 60 ng/ml zusammen mit CHX und anti-Flag-AK eingesetzt und das Apoptoseverhalten der RKO- sowie der induzierten RKOp27-Zellen (+) untersucht. Parallel wurden unbehandelte Proben (unb.) bzw. nur mit 100 ng/ml CHX behandelte Proben (CHX) analysiert. Hierzu wurden die Zellen geerntet, fixiert und zur Zellzyklusanalyse mit PI gefärbt. Auch in hohen Konzentrationen waren RKOp27-Zellen im Vergleich zu RKO-Zellen vor Apoptose geschützt. Bei einer hCD95L-Konzentration von 60ng/ml waren ca. 30% der induzierten RKOp27-Zellen im Vergleich zu 50% der Kontrollzellen im subG1-Bereich nachweisbar. **B**: Eine Erhöhung der TRAIL-Konzentration von 10 ng/ml über 30 ng/ml auf 60 ng/ml bewirkte eine verstärkte Apoptoserate in RKO-Zellen und wirkte sich nur schwach auf die induzierten RKOp27-Zellen (+) aus. Bei einer Behandlung der Zellen mit 60 ng/ml TRAIL ohne Zugabe von CHX (*) zeigte sich zwar eine geringere Apoptoserate, aber die induzierten RKOp27-Zellen blieben im Verhältnis zu den Kontrollzellen protektioniert (3% bzw. 15%). Die Zellen wurden 24h Stunden nach TRAIL-Zugabe geerntet und fixiert und die PI-gefärbte DNA im FACS, zusammen mit unbehandelte Proben (unb.) bzw. nur mit 100 ng/ml CHX behandelte Proben (CHX) analysiert.

Um den Protektionseffekt in den induzierten RKOp27-Zellen mit einer weiteren Nachweismethode für Apoptose zu bestätigen, wurde eine Anfärbung der apoptotischen Zellen mit Annexin V durchgeführt. Annexin V bindet an Phosphatidylserine, die nach ursprünglich asymmetrischer Verteilung im Verlauf der Apoptose an der Außenseite der Zellmembran auftauchen (Koopman et al. 1994). Es bestätigte sich, dass RKO-Zellen sensitiv auf die Zugabe von hCD95L (plus CHX und anti-Flag-Antikörper) reagierten, während induzierte RKOp27-Zellen kaum auf diese apoptoseauslösenden Signale ansprachen. Nur ca. 7% der arretierten Zellen banden Annexin V an ihrer Zelloberfläche im Vergleich zu 32% der proliferierenden RKO-Zellen (Abb. 3.5).

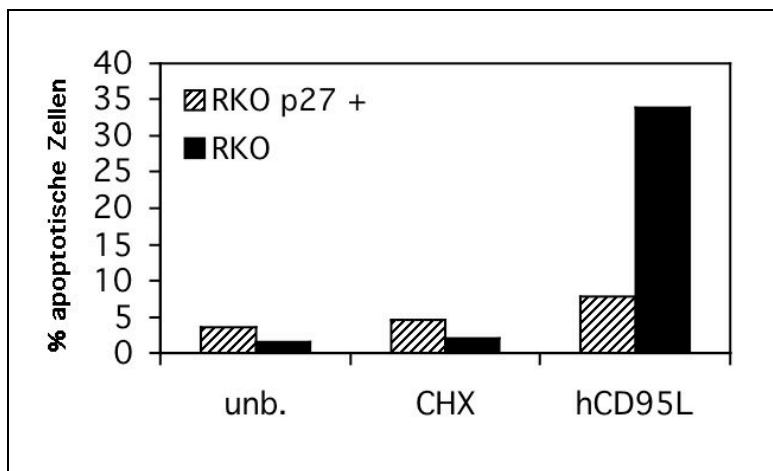
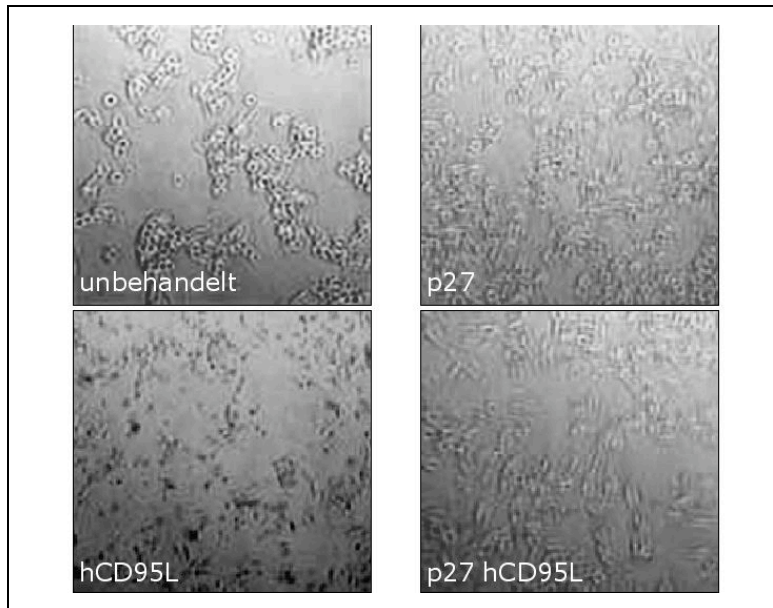


Abb. 3.5:

RKOp27-Zellen binden kein Annexin V nach hCD95L-Behandlung

Nach Zugabe von 10 ng/ml hCD95L, 100 ng/ml CHX und 1 μ g/ml anti-Flag-Antikörper präsentierten apoptotische RKO-Zellen Phosphatidylserine an der Zelloberfläche. Nach Inkubation mit FITC-markiertem Annexin V waren 32% der RKO-Zellen und nur 7% der induzierten RKOp27-Zellen im FL1-Kanal des Durchflußzytometers detektierbar. In den unbehandelten Proben (unb.) wurde kein Apoptosestimulus zugegeben. Die CHX-Proben enthielten zur Kontrolle 100 ng/ml Cycloheximid.

Die Inkubation mit hCD95L bewirkte morphologische Veränderungen der RKO-Zellen. So konnte bereits mit einem Blick durch ein Lichtmikroskop ein Unterschied zwischen nicht induzierten und zur p27-Überexpression induzierten RKO-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.6). Die wesentlich kleineren, geschrumpften apoptotischen Zellen sind deutlich in der hCD95L-behandelten Kontrollzellpopulation, jedoch nicht in der p27-überexprimierenden, mit hCD95L-behandelten Zellpopulation zu sehen.

**Abb. 3.6:**

Keine morphologischen Veränderungen der mit hCD95L behandelten RKO27-Zellen

Das Auslösen der Apoptosekaskade durch die Zugabe von 10 ng/ml hCD95L (+CHX, anti-Flag-Antikörper) zu den RKO-Zellen führte zu morphologischen Veränderungen der Kontrollzellen (hCD95L): die Zellen schrumpften und rundeten sich ab. Dies war jedoch nicht bei mit hCD95L behandelten induzierten RKO27-Zellen (p27 hCD95L) zu erkennen. Die p27-Überexpression wurde durch die Zugabe von Muristeron (3 μ M) zu den Zellen induziert (p27).

3.1.3 Expression der Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche der RKO-Zellen

Um zu untersuchen, an welchem Punkt der durch CD95-Ligand und TRAIL ausgelösten Todessignalkaskade eine Blockade in den p27-induzierten Zellen einsetzte, wurde zuerst die Menge an Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche der RKO- und RKO27-Zellen untersucht. So könnte beispielsweise eine geringere Rezeptormenge zur weitaus schwächeren Apoptoseauslösung in RKO27-Zellen führen. Daher wurde eine FACS-Messung mit Antikörpern gegen CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 und TRAIL-R4 durchgeführt. Abbildung 3.7 zeigt, dass sich die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche in den zwei untersuchten Zuständen (arretiert und proliferierend) nur geringfügig unterschied und somit nicht die Reduktion der Apoptosesignalübermittlung nach Zellzyklusarretierung durch p27-Induktion erklären kann.

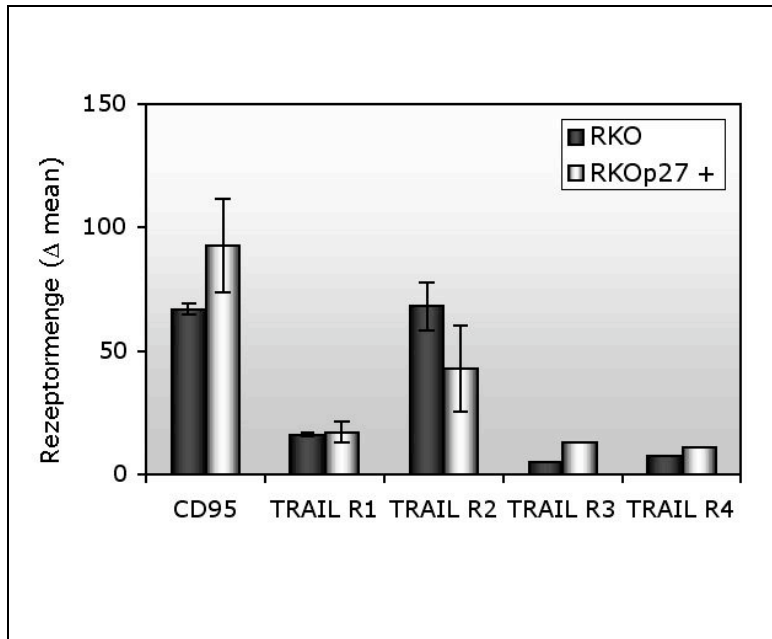


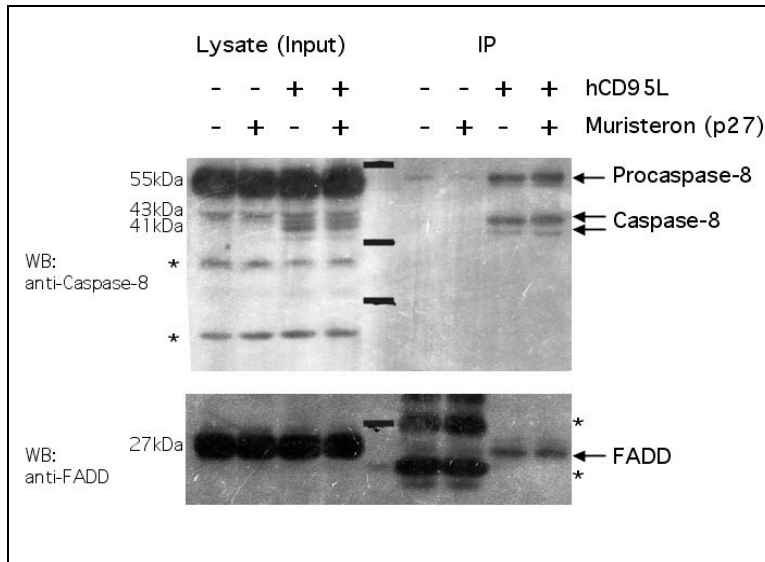
Abb. 3.7:

Geringfügige Unterschiede in der Expression der Todesrezeptoren CD95, TRAIL-R1, -R2, -R3 und -R4 auf der Zelloberfläche der RKO-Zellen

Die Expressionsdichte der Rezeptoren auf RKO- bzw. induzierten RKO p27 (+)-Zellen wurde mithilfe durchflußzytometrischer Messungen bestimmt, indem ein FITC-markierter Zweitantikörper, der die Rezeptor-AKs erkannte, zur Detektion benutzt wurde. Δ mean repräsentiert dabei die Verschiebung der im FL1-Kanal gemessenen Fluoreszenzwerte in höhere Bereiche im Vergleich zur Zweitantikörper Kontrolle, d.h. Zellen, die nur mit FITC-fusioniertem Zweit-AK, aber ohne Erstantikörper inkubiert wurden. Unter Berücksichtigung der Varianz der Experimente konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Hier dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten.

3.1.4 Rekrutierung von FADD und Caspase-8 in den CD95-DISC der RKO-Zellen

Da sich die Menge der an der Oberfläche präsentierten CD95-Moleküle nicht unterschied, wurde nun analysiert, ob Unterschiede in der Zusammensetzung des intrazellulären CD95-DISC (vgl. 1.1.3.3) in den zwei Zuständen „induziert“ (p27-Expression, zellzyklusarretiert) und „nicht induziert“ (ohne bzw. endogenes p27, proliferierend) nach hCD95L-Behandlung nachzuweisen waren. So könnte eine verminderte Rekrutierung der Signalmoleküle FADD und Caspase-8 in den rezeptorassoziierten Signalkomplex eine weitere Signalübertragung reduzieren. Um dies zu untersuchen, wurde eine Immunpräzipitation des DISC-Komplexes durchgeführt (Scaffidi et al. 1999). Das in Abbildung 3.8 dargestellte Experiment zeigte, dass unter den gewählten Bedingungen (einstündige Stimulation der Zellen mit 50 ng/ml hCD95L und 1 μ g/ml anti-Flag-Antikörper) in proliferierenden sowie in den induzierten und damit arretierten RKO p27-Zellen die DISC-Zusammensetzung identisch erschien. FADD und Caspase-8 waren in vergleichbarer Menge in den jeweiligen CD95-Rezeptorkomplex rekrutiert.

**Abb. 3.8:**

Kein Unterschied in der Zusammensetzung des „Death inducing signaling complex“ (DISC) nach Inkubation der induzierten und nicht-induzierten RKOp27-Zellen mit hCD95L

RKO-Zellen wurden im induzierten und nicht induzierten Zustand ohne (-) und mit (+) 50 ng/ml hCD95L und anti-Flag-Antikörper für 1h inkubiert. Die Gesamtzelllysate (Input) sowie das Ergebnis der Protein-A/anti-Flag-AK-IP wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und der Anteil an Caspase-8 und FADD in den unterschiedlich behandelten Proben (\pm Muristeron) untersucht. Beide Moleküle waren im DISC der proliferierenden sowie der arretierten RKOp27-Zellen nachweisbar.

*: unspezifische Banden

3.1.5 Quantifizierung der Caspase-8-Aktivität

Um die Caspase-8-Aktivierung nach Rekrutierung in den Signalkomplex zu überprüfen, wurden die lysierten Proben mit einem spezifischen Caspase-8-Substrat inkubiert. Aktive Caspase-8 spaltet das Substrat, welches daraufhin zu fluoreszieren beginnt. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde im Fluorometer bei 37°C vermessen. Dabei zeigte sich, dass die p27-überexprimierenden RKO-Zellen eine weitaus geringere Caspase-8-Aktivität aufwiesen als die proliferierenden Kontrollzellen (Abb. 3.9 A).

Eine Analyse der Spaltung der Procaspase-8 in ihre aktive Form im Western Blot bestätigte die Aktivitätsstudien. Das kleine Caspase-8 Spaltprodukt p18 war nur in den proliferierenden RKO-Zellen nachweisbar, nicht aber in den zellzyklusarretierten Zellen (Abb. 3.9 B).

Zusätzlich wurde die Expression des Caspase-8-Inhibitors FLIP_S im Western Blot-Verfahren untersucht (vgl. 1.1.5.2). Anhand der eingesetzten Positivkontrolle aus FLIP_S-überexprimierenden Maus-Thymozyten ist zu erkennen, dass RKO-Zellen keine mit dieser Methode nachweisbaren Mengen an FLIP_S besitzen (Abb. 3.9C) und FLIP_S somit nicht für die Inhibierung der Caspase-8-Aktivitätsgewinnung am CD95-DISC verantwortlich ist.

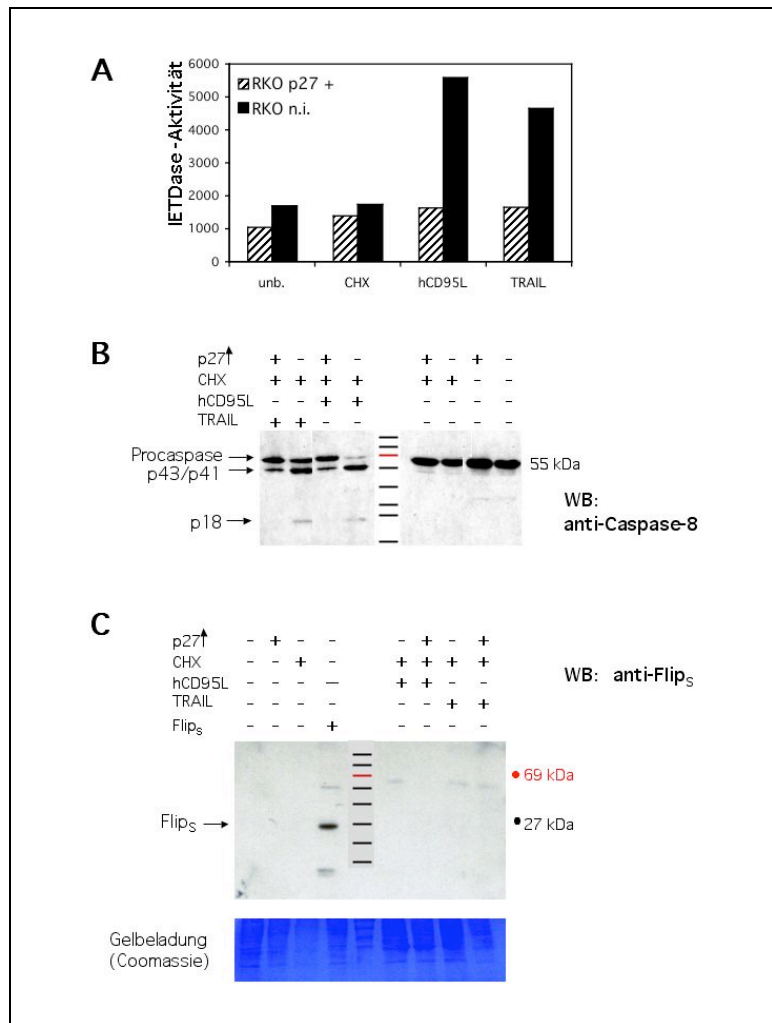


Abb. 3.9 :
Reduzierte Caspase-8-Aktivität in induzierten RKOp27-Zellen

Nicht induzierte (n.i.)- und induzierte RKOp27-Zellen (+) wurden zur Apoptoseinduktion 24 h mit 10 ng/ml hCD95L plus CHX und anti-Flag-AK (hCD95L) oder 10 ng/ml TRAIL plus CHX (TRAIL) behandelt. **A:** Die Caspase-8-Aktivität (IETDase-Aktivität) wurde durch Zugabe eines spezifischen Substrates (Ac-IETD-AFC) zu den Lysaten gemessen. Zur Kontrolle wurden unbehandelte (unb.) und mit 100 ng/ml Cycloheximid (CHX) behandelte Zellen mit analysiert. **B:** In der Western Blot Analyse zeigte sich in den RKO-Zellen die Spaltung der Caspase-8 in ihre Untereinheiten p43/p41 und p18. Die Spaltprodukte waren in den induzierten RKOp27-Zellen nicht (p18) bzw. nur schwach (p43/41) nachweisbar. **C:** FLIP_s ist nicht für die verminderte Caspase-8-Aktivität verantwortlich. Die Gesamtzellextrakte unbehandelter sowie für 24h mit 100 ng/ml CHX, 10 ng/ml hCD95L, 10 ng/ml TRAIL behandelter RKOp27-Zellen mit und ohne Induktion (Muristeron) wurden auf die Expression des Caspase-8-Inhibitors FLIP_s untersucht. Als Positivkontrolle wurde ein Proteinlysate aus FLIP_s-überexprimierenden Maus-Thymozyten eingesetzt. Der eingesetzte Antikörper (Dave-2) erkennt murines und humanes FLIP_s-Protein gleichermaßen. Demnach besitzen RKO-Zellen, unabhängig von ihrer Behandlung, keine nachweisbaren Mengen an FLIP_s.

Die verminderte Caspase-8-Aktivität wirkt sich auf die Spaltung des Bcl-2-Familienmitglieds Bid zu tBid aus. Dies ist für die Weiterleitung des Apoptosesignals in TypII-Zellen über den mitochondrialen Weg ein essentieller Schritt (Li et al. 1998). Daher wurden im nächsten Experiment die mitochondrialen Ereignisse nach CD95-Rezeptoraktivierung näher untersucht.

3.1.6 Untersuchung der mitochondrialen Ereignisse nach Apoptoseinduktion

Der mitochondriale Signalweg spielt im apoptotischen Zelltod von TypII-Zellen eine große Rolle (Scaffidi et al. 1998). Untersuchungen des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe der JC-1-Anfärbung zeigten eine starke Depolarisierung nach Stimulation von proliferierenden RKO-Zellen mit hCD95L oder TRAIL. Die induzierten und daher zellzyklusarretierten RKOp27-Zellen hielten indessen ihr mitochondriales Membranpotential auch nach Stimulation mit Todesliganden aufrecht (Abb. 3.10).

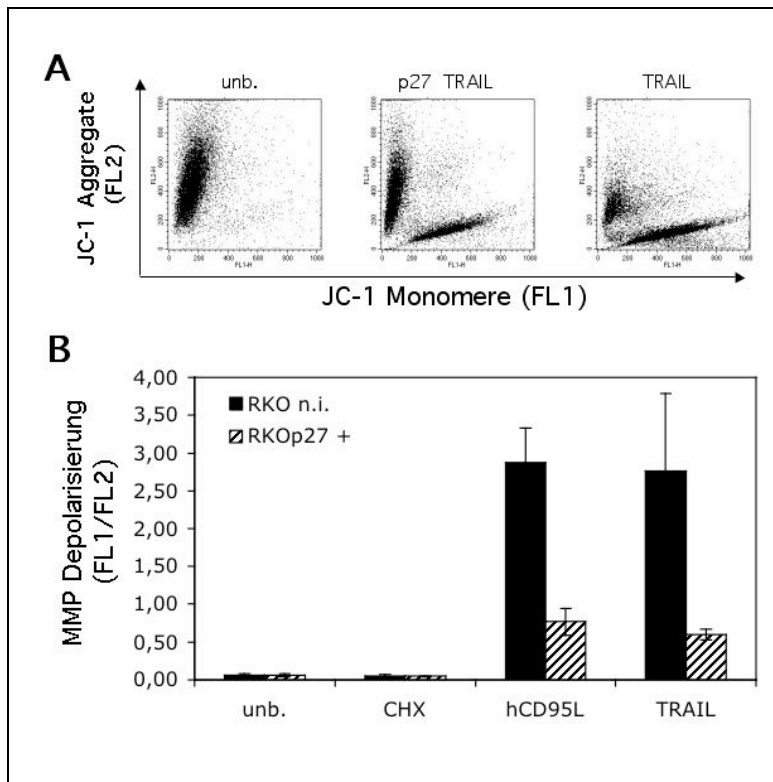


Abb. 3.10:

In RKO p27-Zellen ist keine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) nachweisbar

Die Depolarisierung des MMPs wurde mithilfe des MMP-abhängigen Farbstoffes JC-1 im FACS analysiert. **A:** Lebende (unb.) Zellen bildeten potentialabhängig JC-1 Aggregate, deren Fluoreszenz im FL2-Kanal detektiert wurde. In mit TRAIL (10 ng/ml + CHX) behandelten RKO-Zellen („TRAIL“) führte die Depolarisierung des MMPs zur monomeren JC-1 Form (FL1). Der Großteil der p27-exprimierenden und TRAIL-behandelten („p27 TRAIL“) Zellen war in FL2 detektierbar (JC-1 Aggregate). **B:** Eine Stimulation der Todesrezeptoren mit 10 ng/ml hCD95L (+CHX, anti-Flag-Antikörper) oder 10 ng/ml TRAIL (+CHX) führte zwar in den nicht induzierten proliferierenden TypII-RKO p27-Zellen (RKO n.i.) zum Zusammenbruch des MMPs (FL1/FL2 = 3), jedoch nicht in den G1-arretierten RKO p27 (+)-Zellen (FL1/FL2 < 1). Zusätzlich wurden unbehandelte Proben (unb.) bzw. nur mit 100 ng/ml CHX behandelte Proben (CHX) analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten.

Mitglieder der Bcl-2-Familie beeinflussen die mitochondriale Homöostase und regulieren so die Freisetzung apoptogener Faktoren wie Cytochrom c (Kirkin et al. 2004). Daher wurde in der Western Blot-Analyse das Expressionsniveau dieser Proteine bestimmt. Hierbei wurden Lysate proliferierender RKO-Zellen mit denen arretierter RKO p27-Zellen verglichen. Es zeigte sich, dass p27-überexprimierende Zellen, im Vergleich zu den proliferierenden Kontrollzellen, stark erhöhte Mengen an Bcl-x_L exprimierten (Abb. 3.11).

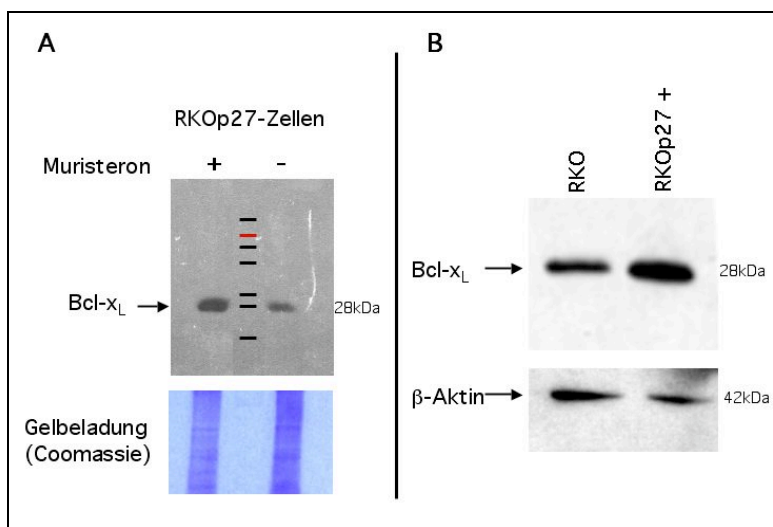


Abb. 3.11:

Erhöhte Bcl-x_L Proteinmengen in p27-überexprimierenden RKO-Zellen

A: Vergleich der Expression von Bcl-x_L in muristeron- und nicht muristeronbehandelten RKO p27-Zellen. Die Induktion führte zur erhöhten Bcl-x_L-Expression in RKO p27-Zellen (+). **B:** Der Vergleich der Bcl-x_L-Expression in proliferierenden RKO-Wildtyp- und induzierten RKO p27-Zellen (+) bestätigte dies. Nach Inkubation der Membran mit anti-Bcl-x_L-AK wurde sie wieder verwendet, um mit der Bestimmung der β-Aktin-Expression die Beladung des untersuchten SDS-Gels mit gleicher Menge an Gesamtprotein zu bestätigen. Induzierte (+) RKO p27-Zellen besaßen höhere Bcl-x_L Proteinmengen als Kontrollzellen (RKO).

Ein weiteres wichtiges Ereignis in der todesrezeptorvermittelten Apoptose von TypII-Zellen stellt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol dar. Um gegebenenfalls Unterschiede in den zwei Ansätzen „induziert“ und „nicht-induziert“ nachzuweisen, wurden Lysate dieser Zellpopulationen hergestellt und in eine zytosolische sowie eine mitochondriale Fraktion aufgetrennt. Schließlich wurde mit einem spezifischen anti-Cytochrom c-Antikörper in der Western Blot-Analyse die Menge an detektierbarem Cytochrom c in den beiden Fraktionen untersucht. Es zeigte sich nach der Inkubation der Kontrollzellen (nicht induziert) mit Todesliganden eine deutliche Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol. Dagegen blieb bei arretierten RKOp27-Zellen der Hauptanteil an Cytochrom c in der mitochondrialen Fraktion nachweisbar (Abb. 3.12).

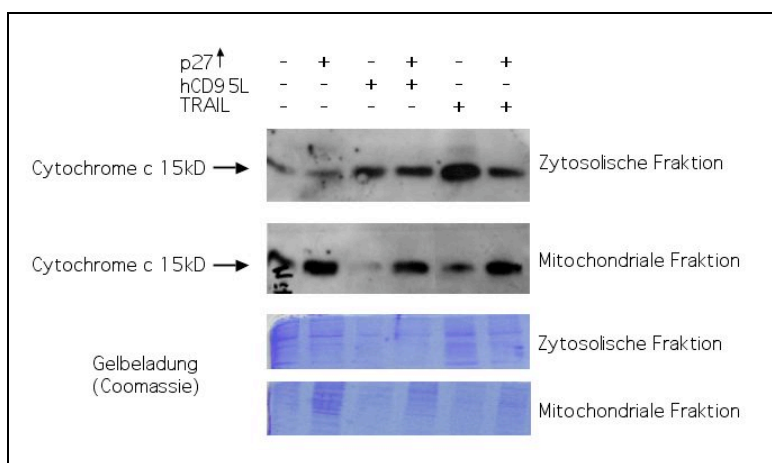


Abb. 3.12:

Verminderte Cytochrom c-Freisetzung der im Zellzyklus arretierten RKOp27-Zellen

Die zu untersuchenden Zellansätze wurden lysiert und anschließend in eine zytosolische und eine mitochondriale Fraktion aufgetrennt. Durch Western Blot-Analyse wurde durch Inkubation der Blotmembran mit anti-Cytochrom c-Antikörper die Menge an Cytochrom c in jeder Fraktion bestimmt. Der Hauptanteil des Cytochrom c blieb bei induzierten RKOp27-Zellen trotz Inkubation mit hCD95L bzw. TRAIL in der mitochondrialen Fraktion.

3.1.7 Analyse der Caspase-3-Aktivität

Zur Bestätigung der vorangegangenen Analysen, die eine verminderte Caspase-8-Aktivierung und Hemmung des mitochondrialen Apoptosesignalübertragungsweges zeigten, wurde nun die Caspase-3-Aktivität untersucht. Hierzu wurde zum einen in fluorometrischen Aktivitätsstudien die Fähigkeit, ein zugegebenes Substrat zu spalten, untersucht (Abb. 3.13 A). Zum anderen wurden in Western Blot-Analysen (Abb. 3.13 B) Caspase-3 Spaltprodukte untersucht und anschließend die Spaltung eines Caspase-3-Zielproteins (PARP) analysiert (Abb. 3.13 C).

Es zeigte sich, dass in proliferierenden RKO-Zellen, nach Zugabe von hCD95L zur Aktivierung des apoptotischen Signalweges, große Mengen an aktiver Caspase-3 gebildet wurden, denn es waren eine hohe Caspase-3-Aktivität, das 20kD große Caspase-3 Spaltprodukt und das gespaltene p85-PARP-Fragment detektierbar. Die zur Induktion der p27-Expression mit Muristeron behandelten RKOp27-Zellen ließen nur eine schwache Caspase-3-Aktivität und keine Spaltungen der Procaspase sowie der PARP-Polymerase erkennen (Abb. 3.13).

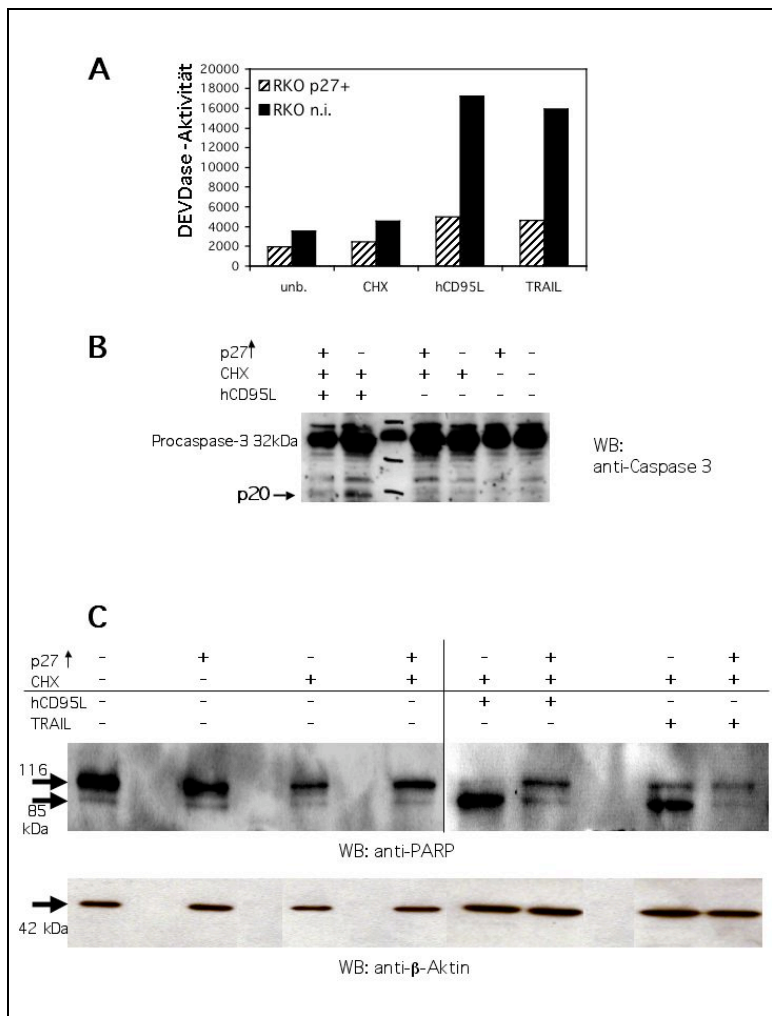


Abb. 3.13:

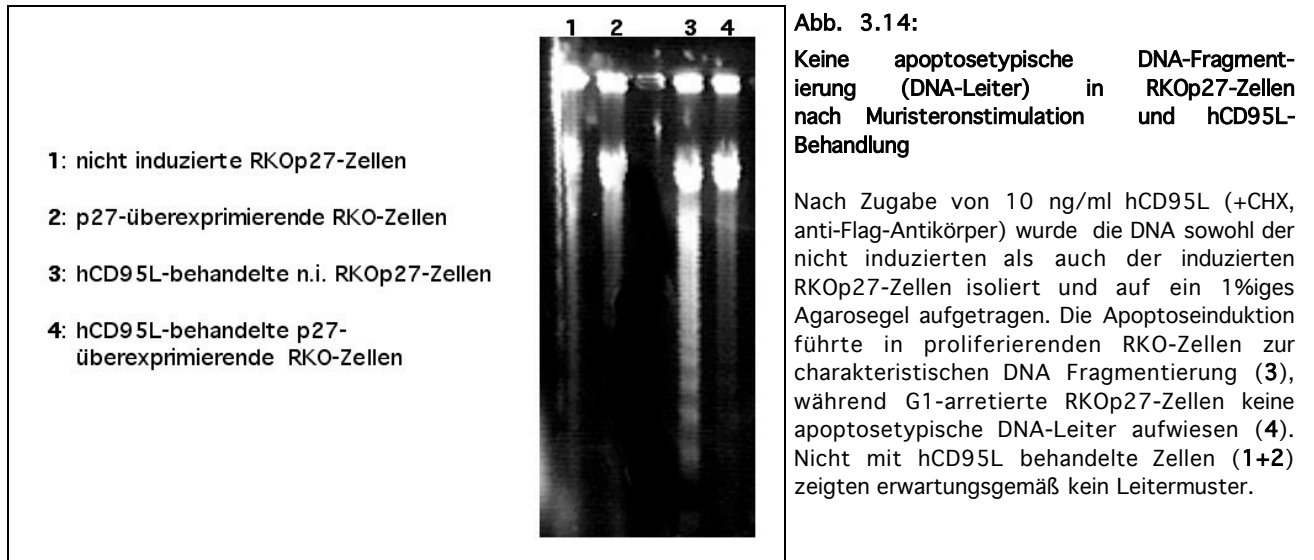
Keine Caspase-3-Aktivierung in hCD95L-behandelten p27-überexprimierenden RKO-Zellen

In induzierten RKOp27-Zellen (+) waren nach Apoptoseinduktion mit 10 ng/ml hCD95L (+CHX, anti-Flag-Antikörper) oder 10 ng/ml TRAIL (+CHX) weder Caspase-3-Aktivität im Fluorometer (A) noch das Spaltprodukt p20 im Western Blot nachweisbar (B). Hohe Caspase-3-Aktivität sowie das p20-Fragment waren jedoch in nicht induzierten proliferierenden RKOp27-Zellen (RKO n.i.) nach Stimulation mit den Todesliganden deutlich zu sehen. C: Die 116 kDa große PARP (oberer Pfeil) wurde in RKO-Zellen von Effektorcaspasen wie z.B. der Caspase-3 zu einem 85kDa großen (unterer Pfeil) und einem 25 kDa kleinen Fragment (nicht gezeigt) gespalten. Die mit Muristeron zur Induktion behandelten RKOp27-Zellen wiesen auch nach Apoptoseauslösung hauptsächlich die nicht gesplattene 116kDa große Form (oberer Pfeil) der Polymerase auf.

Zur Kontrolle wurden zusätzlich unbehandelte (unb.) und mit 100 ng/ml Cycloheximid (CHX) behandelte Zellen analysiert.

3.1.8 Hydrolyse genomischer DNA nach hCD95L-Behandlung

Ein weiteres Merkmal der Apoptose ist die Spaltung der genomischen DNA in $(180\text{bp})_n$ große Fragmente (Wyllie et al. 1980). Dies kann durch das Auftrennen der isolierten DNA in einem Agarosegel gezeigt werden („DNA-Leiter“). Während dieses Charakteristikum in nicht induzierten RKOp27-Zellen nach Auslösung der Apoptosesignalkaskade durch Stimulation mit hCD95L erkennbar war, zeigten induzierte RKOp27-Zellen unter gleichen Bedingungen keinerlei Anzeichen einer DNA-Fragmentierung (Abb. 3.14).



3.1.9 Die Rolle der Proteinkinase C in Zellzyklus- und Apoptoseverhalten der RKO-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es in muristeroninduzierten RKOp27-Zellen zu einer Apoptosehemmung auf der Stufe der Caspase-8-Aktivierung kommt. Gómez-Angelats & Cidlowski zeigen in ihren publizierten Daten, dass die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zur Hemmung der Apoptose auf der Ebene der DISC-induzierten Caspase-8-Aktivierung führt (2001). Die verschiedenen Isoformen der PKC-Familie werden in drei Gruppen unterteilt. Die konventionellen PKCs sind Ca^{2+} -abhängig, während die neuen und atypischen PKC-Isoformen Ca^{2+} -unabhängig aktiviert werden (Gutcher et al. 2003). Daher wurde im folgenden Experiment PMA benutzt, um die PKC in RKO-Zellen zu aktivieren. Es zeigte sich, dass diese Behandlung einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus nach sich zog (Abb. 3.15). So wurde daraufhin die Beteiligung der PKC am Protektionseffekt in den induzierten RKOp27-Zellen untersucht.

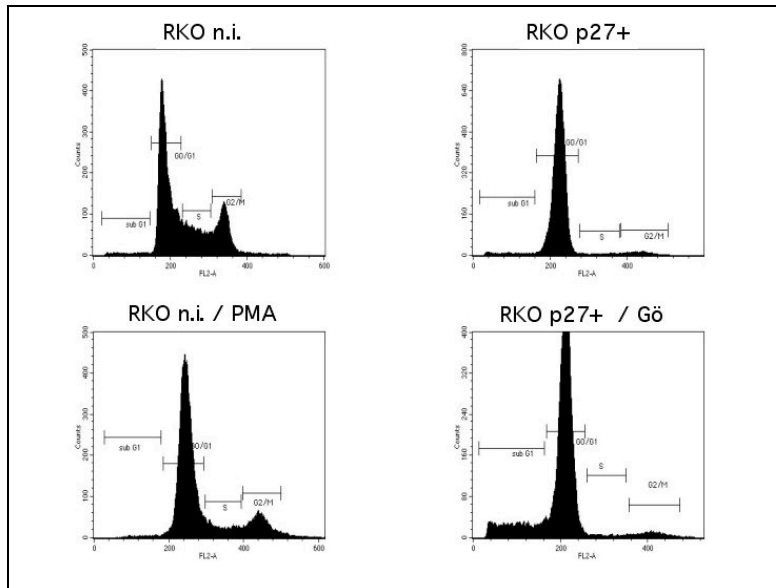


Abb. 3.15:

Eine PMA-Behandlung führt bei RKO-Zellen zum Zellzyklusarrest

Die Erfassung des DNA Gehaltes der unterschiedlich behandelten, geernteten und anschließend permeabilisierten RKO-Zellen mit PI zeigte, dass PMA (20 nM, PKC-Aktivator)-behandelte, nicht induzierte (n.i.) ähnlich den induzierten (+) RKOp27-Zellen einen G1 Arrest aufwiesen, und dass mit 5 μ M Gö6976 (PKC-Inhibitor) behandelte induzierte RKOp27-Zellen (+) zwar immer noch im Zellzyklus arretiert waren, aber nun vermehrt apoptotische Zellen im subG1-Bereich aufwiesen.

Für diesen Versuchsansatz wurden RKO-Zellen mit PMA (20 nM) versetzt, um eine Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen PKC - Isoformen zu erreichen. Durch Zugabe von hCD95L bzw. TRAIL wurde daraufhin Apoptose ausgelöst. Parallel dazu wurden induzierte RKOp27-Zellen mit 5 μ M Gö6976, einem Inhibitor der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen PKC α und PKC β , inkubiert und ebenfalls todesrezeptorvermittelt Apoptose ausgelöst. Wie in Abbildung 3.16 zu sehen ist, führte die Stimulation der Zellen mit PMA zur Suppression der Apoptose, während die Inkubation der Zellen mit Gö6976 den Protektionseffekt der induzierten p27-Expression in RKO-Zellen aufhob. Dies war ein Hinweis darauf, dass Ca^{2+} -abhängige PKC-Isoformen an der Protektion durch p27-Expression und Zellzyklusarrest beteiligt sein könnten. Dargestellt ist jeweils exemplarisch der Anteil apoptotischer Zellen nach Messung des DNA-Gehaltes (PI-Färbung, Abb. 3.16 A) sowie die Messung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe der JC-1 Anfärbung (Abb. 3.16 B).

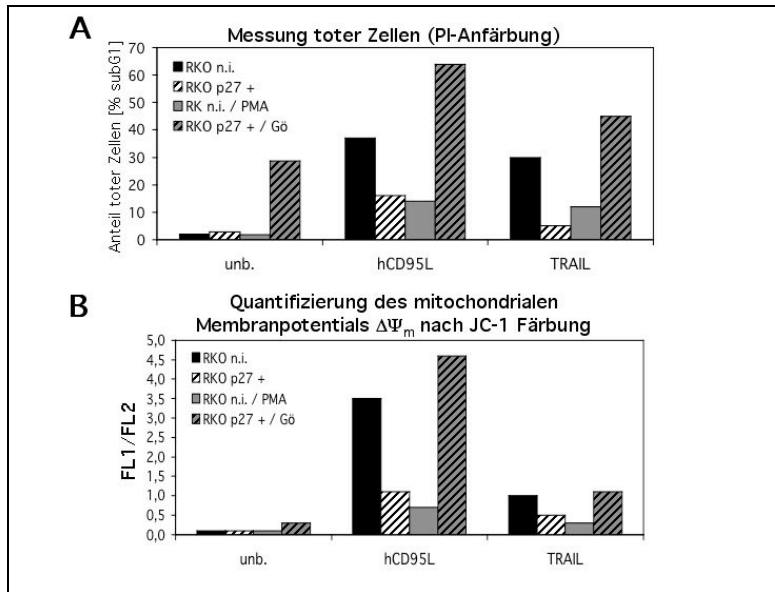


Abb. 3.16:

Hemmung der PKC sensitiviert muristeronstimulierte RKO p27-Zellen wieder für CD95- und TRAIL- induzierte Apoptose

Die durchflußzytometrische Analysen der PI- (A) sowie der JC-1 Färbung (B) ergaben, dass PMA (20nM)- behandelte, nicht induzierte (n.i.) RKO-Zellen (PKC aktiv) geschützt waren gegen hCD95L- bzw. TRAIL Behandlung und dass mit Gö6976 (5µM, Gö) behandelte, induzierte RKO p27-Zellen (+, PKC inaktiv) für diese Art der Apoptoseauslösung sensitiviert wurden. Zusätzlich wurden nicht mit Ligand behandelte Proben (unb.) analysiert. Zur hCD95L-Behandlung wurden 10 ng/ml hCD95L, 100 ng/ml CHX und 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper benutzt (hCD95L). Für die TRAIL-Behandlung wurde mit 10 ng/ml TRAIL und 100 ng/ml CHX inkubiert (TRAIL).

Eine Analyse der Proteine Caspase-8, p21 und p27 im Western Blot-Nachweisverfahren (Abb. 3.17) zeigte eine Spaltung der Procaspase-8 in induzierten (zellzyklusarretierten) RKO p27-Zellen nach Apoptosestimulation und Vorinkubation mit Gö6976 (5µM), während kein Spaltprodukt in PMA-behandelten, nicht induzierten RKO-Zellen detektierbar war. Die Inkubation der Zellen mit PMA führte nicht nur zur Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen, sondern auch zur erhöhten Expression von p21 in nicht mit Todesligand behandelten Zellen, während die PMA-Behandlung zusätzlich mit Todesligand plus Cycloheximid (welches die Proteinneusynthese verhindert) die p21-Expression nicht beeinflusste (Abb. 3.17).

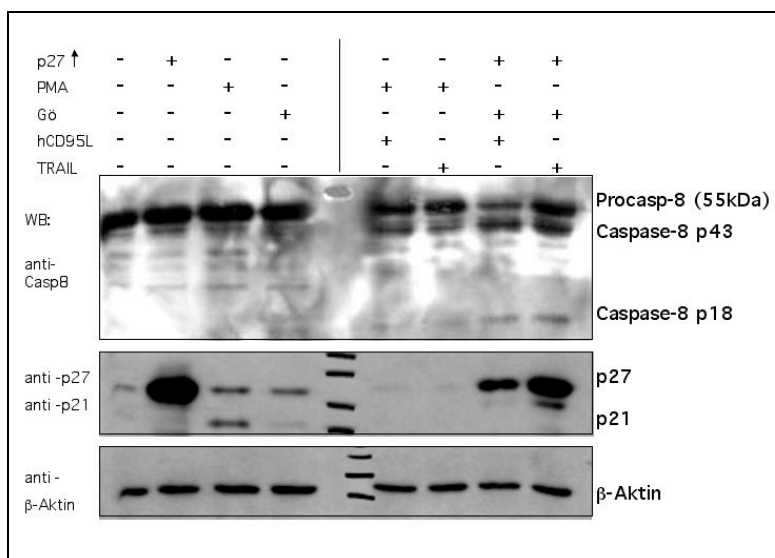


Abb. 3.17:

Eine Hemmung der PKC sensibilisiert muristeronstimulierte RKO p27-Zellen für CD95L- und TRAIL- induzierte Apoptose

Die Erfassung der Caspase-8-Spaltprodukte in der Western Blot-Analyse bestätigte, dass PMA-behandelte Zellen vor Apoptose nach hCD95L- und TRAIL- Zugabe geschützt waren, während in Gö6976-behandelten induzierten RKO p27-Zellen das Caspase-8-p18 Spaltprodukt detektiert wurde. Die Inkubation der Blotmembran mit Antikörpern gegen p21 und p27 zeigte, dass PMA die Expression von p21 in der nicht mit Todesligand behandelten Probe erhöhte.

3.1.10 Ecdysonhomologe inhibieren CD95L- und TRAIL-induzierte Apoptose in Säugerzellen

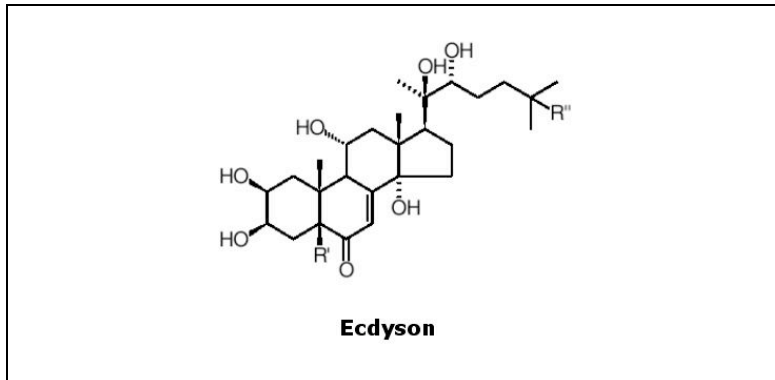


Abb. 3.18:
Grundstruktur der Ecdysteroide

Der Name Ecdyson leitet sich von der Funktion als Häutungshormon der Insekten ab (εκδυσσο: Häutung, Heraus kriechen). Verschiedene Homologe unterscheiden sich durch unterschiedliche Hydroxylierungen an der Seitenkette.

Trotz der Annahme, dass Insektenhormone (Abb.3.18) keinen Einfluss auf die Signaltransduktionswege von Säugerzellen haben (Saez et al. 2000), wurde im folgenden Experiment das Ecdysonhomolog Muristeron zu RKO-Wildtypzellen gegeben, die kein induzierbares Ecdysonsystem enthielten. Erstaunlicherweise wurden auch diese Zellen gegenüber hCD95L-induzierter Apoptose durch Muristeron protektioniert (Abb. 3.19A).

Wie in Abbildung 3.19B dargestellt, war dieser Protektionseffekt konzentrationsabhängig. Eine relativ niedrige Muristeronkonzentration, die nicht mehr für die p27-Induktion in RKOp27-Zellen ausreichte, beeinflusste kaum das Apoptoseverhalten der Zellen. Nur 50 ± 3 % der RKOp27-Zellen befanden sich nach Zugabe von $0,3 \mu\text{M}$ Muristeron in der G₀/G₁-Zellzyklusphase (Daten nicht gezeigt).

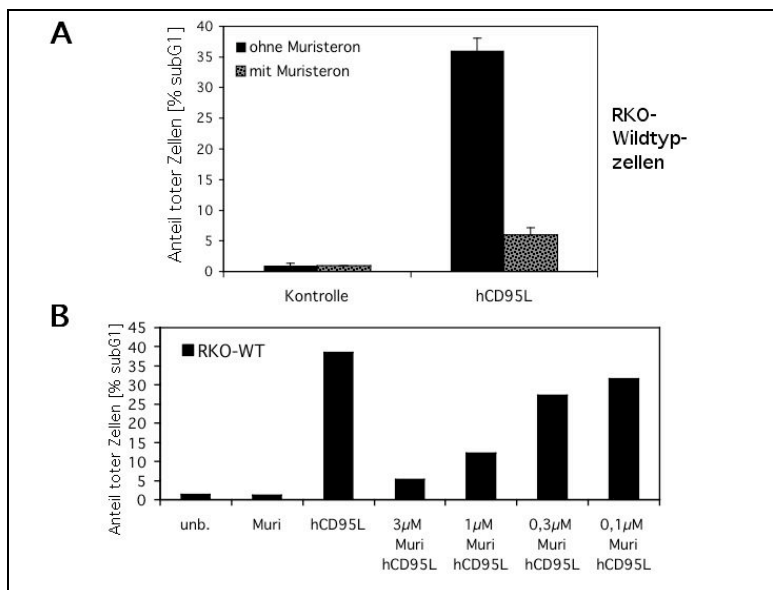


Abb. 3.19:
Protektiver Effekt des Ecdysonhomologs Muristeron

A: RKO-Wildtypzellen wurden 24h mit oder ohne (Kontrolle) $3 \mu\text{M}$ Muristeron und anschließend für weiter 24h Stunden mit (hCD95L) 10 ng/ml hCD95L plus CHX und anti-Flag-Antikörper behandelt. Die PI-Anfärbung nach Nicoletti zeigte, dass die mit Muristeron behandelten RKO-Zellen kaum starben (7% in subG1), während 35% der nicht mit Muristeron behandelten RKO-Zellen apoptotisch waren. Es wurde der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten berechnet. **B:** Muristeron wurde in den Konzentrationen 3, 1, 0,3 und $0,1 \mu\text{M}$ zu nicht induzierbaren RKO-Wildtypzellen (RKO-WT) gegeben. Die Protektion gegenüber hCD95L-vermittelter Apoptose ließ mit niedriger Konzentration deutlich nach.

Weiterhin zeigte sich, dass neben Muristeron auch Ponasteron und das synthetische GS-E in der Lage waren, die durch hCD95L ausgelöste Apoptosekaskade zu stoppen (Abb. 3.20).

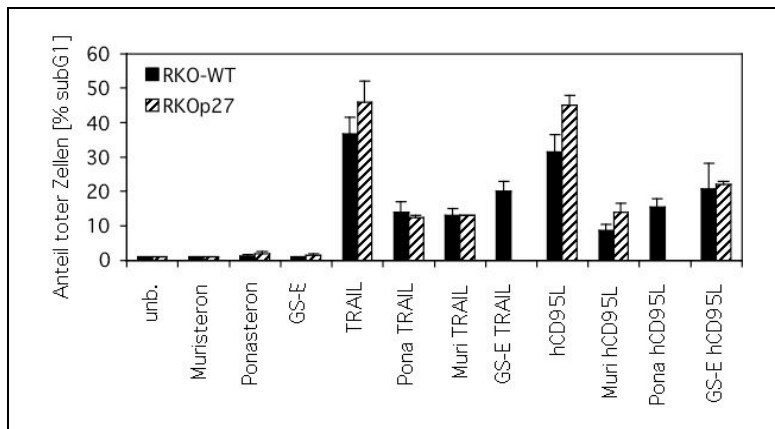


Abb. 3.20:

Protektionseffekt aller getesteten Induktoren

Muristeron (3µM), Ponasteron (3µM) und GS-E (9µM) hemmten die hCD95L (10 ng/ml hCD95L, 100 ng/ml CHX, 1 µg/ml anti-Flag-AK)- bzw. TRAIL (10 ng/ml TRAIL, 100 ng/ml CHX)-vermittelte Apoptose in induzierbaren RKO p27- und nicht-induzierbaren RKO-Wildtypzellen gleichermaßen. Es wurde die Menge toter Zellen im subG1-Bereich des Zellzyklusprofils der PI gefärbten Proben im FACS analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten.

Da die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bekanntermaßen zur Inhibition von Apoptose führt (Vivanco & Sawyers 2002), wurde im folgenden Experiment (Abb. 3.21) eine Hemmung der PI3K durch Zugabe von Ly294002 (25 µM) zu den RKO-Zellen herbeigeführt und anschließend das Apoptoseverhalten der mit Muristeron behandelten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass ein Blocken der PI3K-Aktivität den durch Muristeron verursachten Protektionseffekt wieder rückgängig machte. Da die Inkubation von RKO-Zellen mit Ly294002 alleine bereits in geringem Ausmaß Apoptose induzierte, wurden mit Wortmannin (Wo) und Akt-Inhibitor (AI) zwei weitere Inhibitoren der PI3K bzw. der anti-apoptotischen Akt/PKB-Kinase (Phosphorylierungsziel der PI3K) eingesetzt. Mit beiden Substanzen wurde wie mit Ly294002 der protektive Effekt der Ecdysonhomologe aufgehoben (Abb. 3.21).

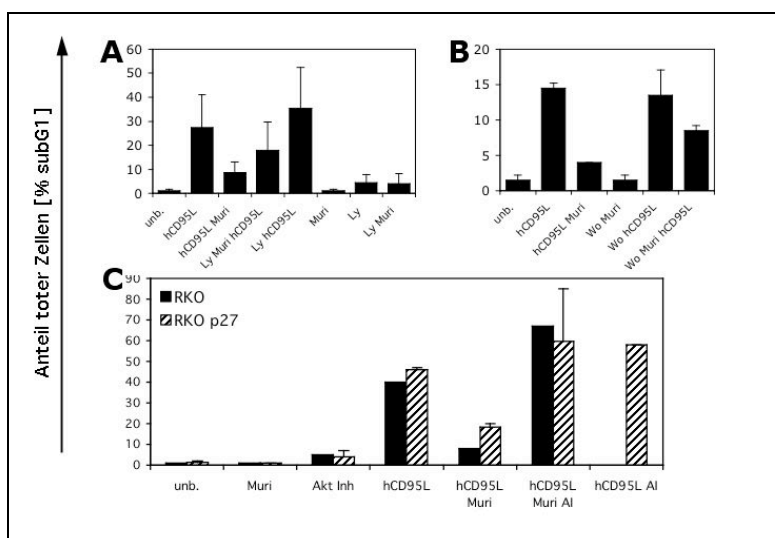


Abb. 3.21:

Muristeron aktiviert den anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalweg

Die Zugabe des PI3K-Inhibitors Ly294002 (Ly, 25 µM, **A**), des PI3K-Inhibitors Wortmannin (Wo, 200 µM, **B**) sowie des Akt-Inhibitors AI (25 µM, **C**) zu RKO-Zellen machten den durch 3µM Muristeron (Muri) hervorgerufenen Protektionseffekt gegenüber CD95-vermittelter Apoptose rückgängig. Nach der Inkubation mit 10 ng/ml hCD95L (+CHX, anti-Flag-Antikörper) wurden die Zellen geerntet, fixiert, mit PI gefärbt und im FACS zusammen mit unbehandelten Kontrollzellen (unb.) analysiert. Dargestellt sind in **A** die Mittelwerte aus 5, in **B** und **C** aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

Da in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen eine wichtige Rolle in der Protektion der induzierten RKOp27-Zellen spielten (Abb. 3.16), wurde die Rolle der PKC im ecdysonbedingten Protektionseffekt untersucht (Abb. 3.22). Es zeigte sich, dass eine Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKCs mit Gö6976 ($5\mu\text{M}$) die Protektion teilweise, aber nicht vollständig, aufhob (Abb. 3.22).

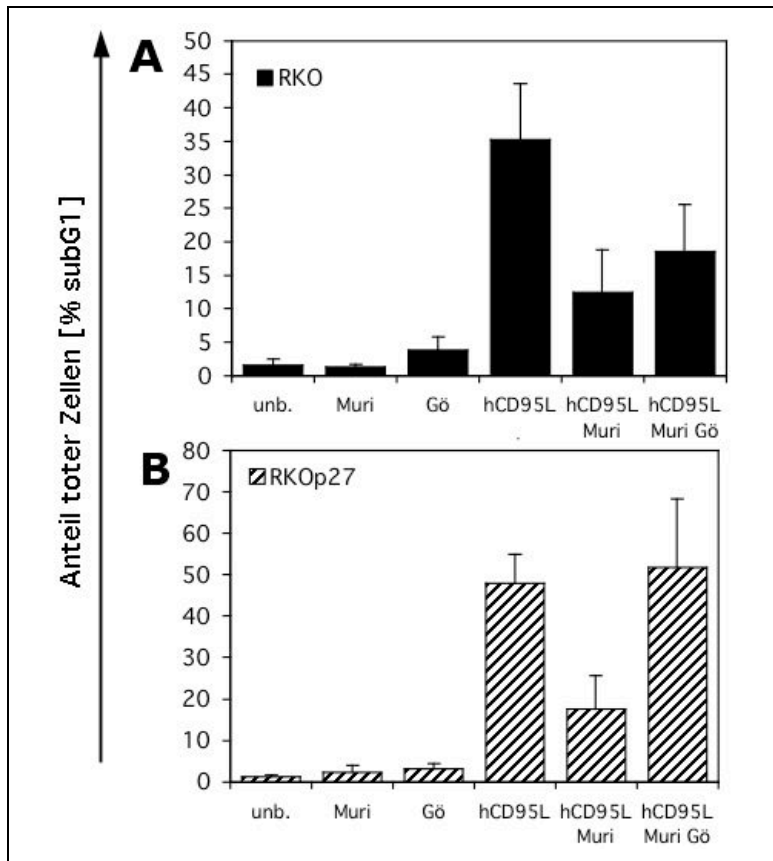


Abb. 3.22:

Eine Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen hebt die Protektion durch Muristeron nicht vollständig auf

A: Die Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen PKC Isoformen mit dem Inhibitor Gö6976 ($5\mu\text{M}$, Gö) hob die durch $3\mu\text{M}$ Muristeron (Muri) verursachte Protektion in RKO-Wildtypzellen teilweise wieder auf. Apoptose wurde durch die Zugabe von 10 ng/ml hCD95L, 100 ng/ml CHX und $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ anti-Flag-AK (hCD95L) ausgelöst.

B: Der Protektionseffekt in induzierten RKOp27-Zellen (Muri) wurde durch den PKC-Inhibitor Gö6976 (Gö) vollständig aufgehoben. Apoptose wurde durch die Zugabe von 10 ng/ml hCD95L (+CHX, anti-Flag-Antikörper) für 24h ausgelöst. Zur Kontrolle wurden bei A und B unbehandelte Zellen mit untersucht (unb.). Dargestellt sind jeweils bei A und B die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren wurde die Bcl-x_L -Expression, welche in p27-überexprimierenden RKO-Zellen erhöht war (vgl. Abb. 3.11), nun in muristeronbehandelten RKO-Zellen per Western Blot-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass die Zugabe von Muristeron zu RKO-Wildtypzellen (ohne induzierte p27-Überexpression) bereits eine Hochregulation der Bcl-x_L -Proteinexpression zur Folge hatte. Auffällig ist auch, dass in den durch Muristeron protektionierten Zellen bei hCD95L-Zugabe Bcl-x_L nicht abgebaut wurde, was in apoptotischen Zellen nach Bcl-x_L -Spaltung durch Caspasen geschah (Abb. 3.23, Kirsch et al. 1999).

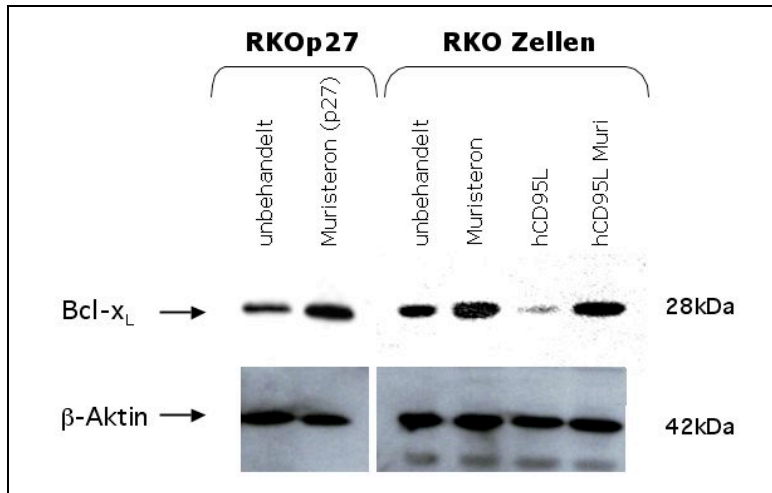


Abb. 3.23:

Nach Zugabe des Ecdysonhomologs Muristeron erhöht sich die Bcl-x_L-Proteinexpression

Muristeron (Muri) -induzierte RKOp27-Zellen wiesen erhöhte Mengen an Bcl-x_L auf. Mit 3 μ M Muristeron behandelte RKO-Wildtypzellen wiesen ebenfalls erhöhte Bcl-x_L-Mengen auf und zeigten keinen proteolytischen Abbau des Proteins nach Inkubation mit 10 ng/ml hCD95L, 100 ng/ml CHX und 1 μ g/ml anti-Flag-AK (hCD95L).

Weitere Untersuchungen des CD95-Signalweges ergaben, dass Muristeron bereits auf der Stufe der Caspase-8-Aktivierung anti-apoptotisch wirkte, denn es war eine verminderte Caspase-8-Aktivität messbar (Abb. 3.24 B). Eine Analyse der Expression des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche zeigte keine durch Muristeron bedingte Beeinflussung der Expression (Abb. 3.24 A). Jedoch waren Auswirkungen auf die mitochondrialen Ereignisse, die nach Caspase-8-Aktivierung folgen, nachweisbar. So führte eine Behandlung mit Muristeron zur verminderten Cytochrom c - Freisetzung (Abb. 3.24 C), zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 3.24 D) und zu niedrigerer Caspase-3-Aktivität nach hCD95L-Behandlung (Abb. 3.24 E). Diese Ergebnisse entsprachen denen, die mit den muristeronbehandelten RKOp27-Zellen erhalten worden waren, in denen p27 induziert und überexprimiert wurde (vgl. Abb. 3.7 - 3.13).

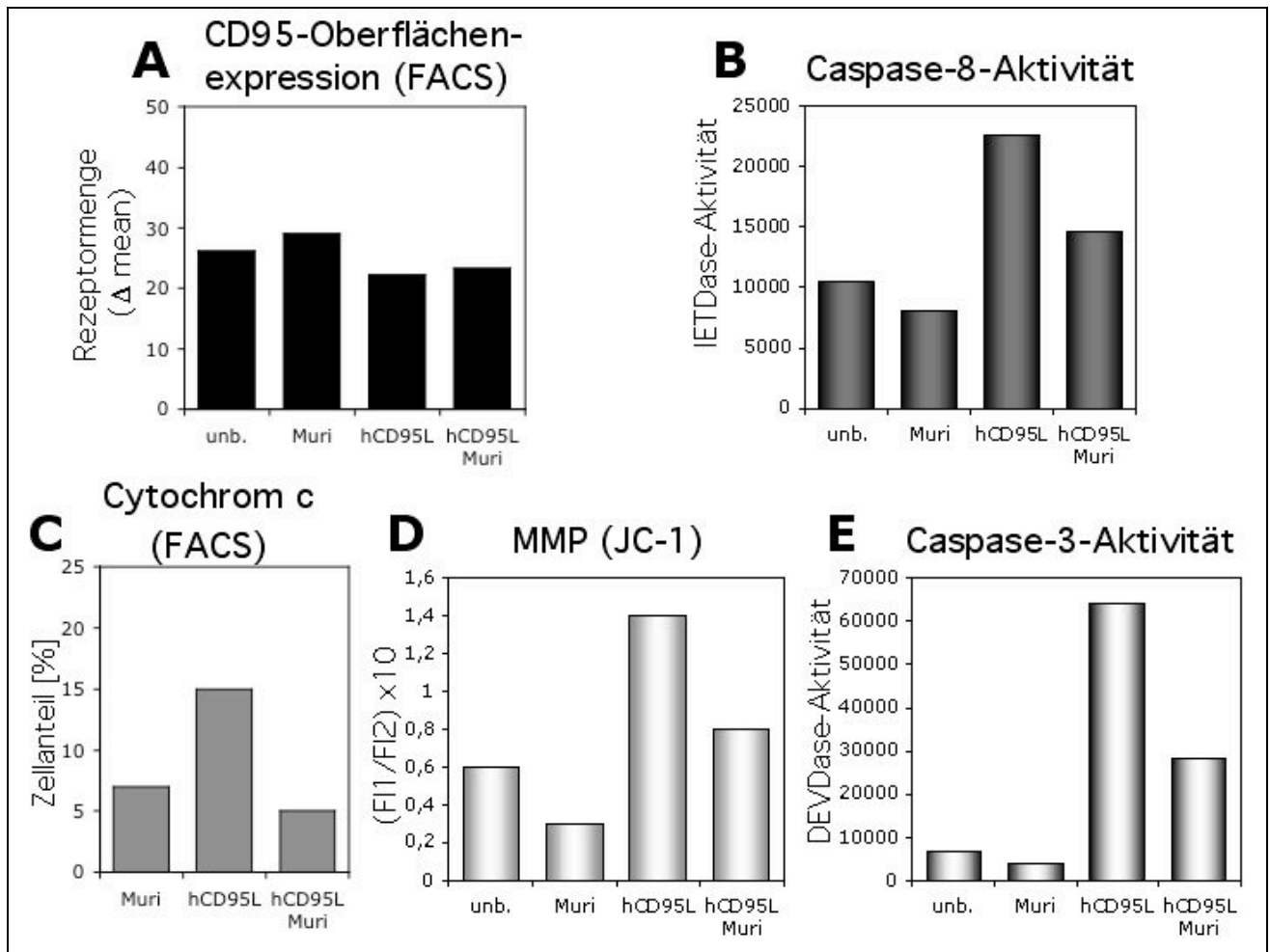


Abb. 3.24: Muristeron hemmt die CD95-vermittelte Apoptose auf der Stufe der Caspase-8-Aktivierung

In fünf verschiedenen (A-E) Apoptoseassays wurden mit $3\mu\text{M}$ Muristeron (Muri)-, mit 10 ng/ml hCD95L plus 100 ng/ml CHX plus $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ anti-Flag-AK (hCD95L)- und in Kombination (hCD95L Muri)-behandelte sowie unbehandelte (unb.) RKO-Zellen untersucht. **A:** Muristeron beeinflusste nicht die Expression des CD95 auf der Zelloberfläche (vgl. Abb. 3.7). **B:** Durch Behandlung der Zellen mit Muristeron kommt es zur verminderten Caspase-8-Aktivierung (vgl. Abb. 3.9). **C:** Eine Behandlung mit Muristeron verhinderte die Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) aus den Mitochondrien der Zellen. Dabei wurde das nicht ins Zytoplasma freigesetzte Cyt c mithilfe eines spezifischen anti-Cyt c - AKs im FACS detektiert und somit der Anteil an freigesetztem Cyt c bestimmt. **D:** Eine Behandlung mit Muristeron hielt das mitochondriale Membranpotential (MMP) aufrecht, eine Depolarisierung war nicht nachweisbar (JC-1 Färbung, vgl. Abb. 3.10). **E:** Muristeron verhinderte die Aktivierung der Caspase-3 (vgl. Abb. 3.13).

3.1.11 Muristeron beeinflusst die Genexpression der RKO-Zellen

Um zu überprüfen, ob das Steroidhormon Muristeron Einfluss auf die Genexpression der RKO-Zellen hat, wurde eine Genexpressionanalyse durchgeführt. Hierfür wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden beladene HG-U95A-Chips (mit ca. 12.000 Sequenzen) der Firma *Affymetrix* verwendet. Aus den zu untersuchenden Zellen (mit und ohne Muristeron- sowie mit und ohne hCD95L-Behandlung) wurde die RNA isoliert, in cDNA umgewandelt und die Hybridisierung mit den genspezifischen Oligonukleotiden der Chips untersucht. Die Inkubationszeit mit Muristeron ($3\mu\text{M}$) betrug 48 Stunden, während hCD95L (50 ng/ml) plus anti-Flag-AK ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) für 24 Stunden

zugegeben wurde. Demzufolge wurden vier Proben untersucht: unbehandelt (Ko), muristeronbehandelt (Muri), hCD95L-behandelt (hCD95L) sowie Muristeron- und hCD95L-behandelt (Muri hCD95L). Dabei wurden drei Vergleiche analysiert:

- 1) hCD95L – Ko
- 2) Muri hCD95L – Ko;
- 3) Muri – Ko

In Tabelle 3.2 ist das Ergebnis der Analyse aufgelistet. Es wurden nur die durch Muristeron beeinflussten Gene berücksichtigt, d.h. Gene, die im Vergleich (1) unbeeinflusst blieben, aber in Vergleich (2) und/oder (3) dereguliert waren. Bei der Auswertung der Daten wurden nur die Gene berücksichtigt, die über das 2,5-fache hinaus unterschiedlich exprimiert waren. Insgesamt waren im Vergleich (2) 60 und im Vergleich (3) 32 Gene unterschiedlich reguliert (Filter 2,5).

Muristeron verändert in RKO-Zellen die Genexpression verschiedener Gene, z.B. Retinol-Dehydrogenase (+16), IL-8 (+12) und MINOR (+16). Diese drei wurden durch die Behandlung der Zellen mit Muristeron stärker exprimiert als in den nicht mit Muristeron behandelten Zellen.

In beiden Vergleichen waren gleichzeitig nur drei Gene dereguliert: *DYRK*, *Oligophrenin 1* und *MNB*. *DYRK* und *MNB* wurden in den muristeronbehandelten Zellen in einem weitaus geringeren Anteil exprimiert, als in nicht mit Muristeron behandelten Zellen, während *Oligophrenin* nach Muristeronbehandlung stärker exprimiert wurde. Die Genprodukte *DYRK* und *MNB* sind Kinasen, so phosphoryliert und aktiviert z.B. *DYRK* den Forkhead-Transkriptionsfaktor *FKHR*. *Oligophrenin* ist ein Mitglied der GAP-Familie, welche Rho-GTPasen in ihren inaktiven Zustand überführen. Welche Rolle diese drei Gene bzw. Genprodukte in der Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose spielen könnten ist unklar.

Genbank Nr.	- eine Auswahl - Name Gen / mRNA	Signalstärke		
		Muri	hCD95L -Ko	Muri-Ko
M27492	Interleukin 1 receptor	-16	-	-
M28130	Interleukin 8	+12,32	-	-
M77349	TGF β induced gene product (BIGH3)	-	-	+10,82
D87116	MAP kinase kinase 3b	+2,96	-	-
-	Endothelial Cell Growth Factor 1	+ 8,94	-	-
U86214	Fas-associated death domain protein interleukin-1 β -converting enzyme (Caspase 10b)	-	-	+7,73
X12556	Dbl proto-oncogene	-	-	+4,96
L36719	MAP kinase kinase 3 (MKK3)	+3,07	-	-
AF037062	Retinol dehydrogenase	-	-	+16,08
X86019	PRPL-2	-	-	+16,08
U58496	Mnb protein kinase homolog hp8b (DYRK)	-14,52	-	-4,58
AJ001189	Oligophrenin 1	+4,62	-	+ 6,91
U12767	Mitogen induced nuclear orphan receptor (MINOR)	+16,16	-	-
U52373	Serine/threonine kinase MNB (mnb)	-7,84	-	-13,62

Tab. 3.2: Effekte des Steroidhormons Muristeron auf die Genexpression der RKO-Zellen

Aus RKO-Zellen isolierte RNA wurde zur Genexpressionsanalyse mit *Affymetrix* HG-U95A-Chips eingesetzt. Zur Auswertung wurde ein Filter von 2,5 gesetzt, d.h. es wurden nur Gene berücksichtigt, die um mehr als das 2,5-fache unterschiedlich exprimiert werden (gemessen anhand der Signalstärke). Untersucht wurden folgende Proben: unbehandelt (Ko), mit 3 μ M Muristeron behandelt (Muri) und mit 50 ng/ml hCD95L + 1 μ g/ml anti-Flag-AK behandelt (hCD95L). Es wurden jeweils die muristeronbehandelten Proben mit der unbehandelten Probe verglichen. Positive Zahlen bedeuten demnach im Vergleich mit den nicht-muristeronbehandelten Proben eine stärkere Expression in den mit Muristeron behandelten Proben, während negative Zahlen auf eine verminderte Expression hinweisen.

3.2 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen mithilfe eines durch AP21967 induzierbaren Genexpressionssystems für die Expression des CDK-Inhibitors p27

3.2.1 „All-in-one“ p27- Vektor Genexpressionssystem (*ARIAD*)

Da sich das ecdysoninduzierbare Genexpressionssystem aufgrund seines anti-apoptotischen Nebeneffektes nicht zur Apoptoseuntersuchung eignete, wurde versucht, ein alternatives induzierbares Genexpressionssystem in RKO-Zellen zu etablieren. Hierzu wurde ein Expressionssystem der Firma *ARIAD* mit retroviralem „All-in-on“-Vektor (artifizieller Transkriptionsfaktor und Zielgen-Kassette in einem Vektor) verwendet. Dieser Vektor enthält eine Aktivierungs- sowie eine DNA-Bindungsdomäne, die nach Zugabe einer Dimerisierungssubstanz, welche an beide Domänen bindet, die Transkription des Zielgens („Insert“, p27) bewirken. Im Folgenden werden die mit dem „All-in-one“-p27 Konstrukt erzielten Ergebnisse beschrieben. Nach der retroviralen Transduktion der RKO-Zellen wurden diese mit G418 selektioniert und schließlich über 100 einzelne resistente Klone in einem Vortest auf Induzierbarkeit untersucht. Dazu wurden die Zellen in 24-Lochplatten ausplattiert und die

Dimerisierungssubstanz AP21967 zugegeben. Daraufhin wurde das Wachstumsverhalten anhand der Gelbfärbung (= Medium verbraucht) oder einer ausbleibenden Verfärbung (Zellen nicht gewachsen, Hinweis auf p27 Überexpression) des Mediums begutachtet. Das Zellzyklusprofil langsam wachsender Klone wurde in einer FACS-Analyse untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tab. 3.2. aufgelistet.

Klon Nr.	% Zellen in G1 n.i. (nicht induziert)	% Zellen in G1 induziert mit 25 nM AP	% Zellen in subG1 n. i., hCD95L	% Zellen in subG1 AP, hCD95L
RKO WT	43	51	21	16
10	48	60	6	3 *
22	42	51	15	11
23	44	54	19	14
44	44	53	10	9
45	49	53	11	10
49	48	59	27	26
61	48	61	26	20
62	46	58	7	7
82	49	58	33	38
88	45	58	7	3
92	44	58	9	7
96	39	57	8	9
101	40	58	7	8
108	46	55	44	38

Tab. 3.3: Induktion des p27-ARIAD-Systems in einer Auswahl selektionierter RKO-Zellklone

Die in einem Vortest ausgewählten Klone wurden auf ihre p27-Induzierbarkeit sowie ihr Apoptoseverhalten hin untersucht. Dazu wurden die Zellen mit und ohne AP21967 für 24h kultiviert und z.T. mit 20 ng/ml hCD95L, 1µg/ml anti-Flag und 100 ng/ml CHX für 5h stimuliert. Dabei fiel auf, dass u. a. Klon Nr. 10 (RKO10) nicht auf den Apoptosestimulus reagierte. RKO10*: hier befanden sich 82% in G1 nach Behandlung mit AP21967, hCD95L, anti-Flag-AK und CHX (nicht gezeigt).

3.2.2 Charakterisierung der RKO10 (ARIADp27)-Zellen

Die RKO10-Zellen fielen in der oben beschriebenen Untersuchung aus zwei Gründen auf. Zum einen war dieser Zellklon wie andere Klone auch, z.B. Nr. 88, nicht hCD95L sensitiv, zum anderen wurden diese Zellen nach Apoptosestimulation durch Todesrezeptorligand zu 82% in der G0/G1-Zellzyklusphase arretiert (Daten nicht gezeigt). Daher wurden diese Zellen weiter untersucht (Abb.3.25). Dabei zeigte sich, dass die Dimerisierungssubstanz AP21967 nun offensichtlich nur noch einen schwachen Effekt auf die p27-Induktion hatte (ca. 50% der Zellen in der G0/G1-Phase, Abb. 3.25). Wurden jedoch hCD95L, anti-Flag-Antikörper und CHX zugegeben, um die Apoptosekaskade auszulösen, sammelten sich 72±4% der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Die alleinige Zugabe von anti-Flag-Antikörper oder hCD95L führte nicht zu diesem Effekt. Die Inkubation der

RKO10-Zellen mit Cycloheximid resultierte in einer Ansammlung von $70 \pm 3,5\%$ der Zellen in der G₀/G₁-Zellzyklusphase. Dieser G₀/G₁-Arrest wurde noch verstärkt, wenn AP21967 zu den Zellen gegeben wurde und nach 24 Stunden für weitere 24 Stunden zusätzlich hCD95L, anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid zugeführt wurden. In diesem Fall befanden sich $79 \pm 5,1\%$ der Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus. Der Versuch, mit TRAIL Apoptose auszulösen, führte ebenfalls zu einem G₁-Arrest in $81 \pm 2,1\%$ der Zellen (Abb. 3.25 B), ohne jedoch apoptotisch zu wirken. Eine Analyse der p27-Proteinexpression ergab, dass RKO10-Zellen im Vergleich mit RKO-Wildtypzellen und anderen Klonen im unbehandelten Zustand p27 überexprimierten. Dies wurde durch CHX- oder AP-Behandlung nicht gesteigert (Daten nicht gezeigt). Da die RKO10-Zellen unabhängig von AP21967 und CHX-Zugabe apoptoseresistent waren (Abb. 3.25 A), konnten sie nicht zu Apoptoseuntersuchungen genutzt werden.

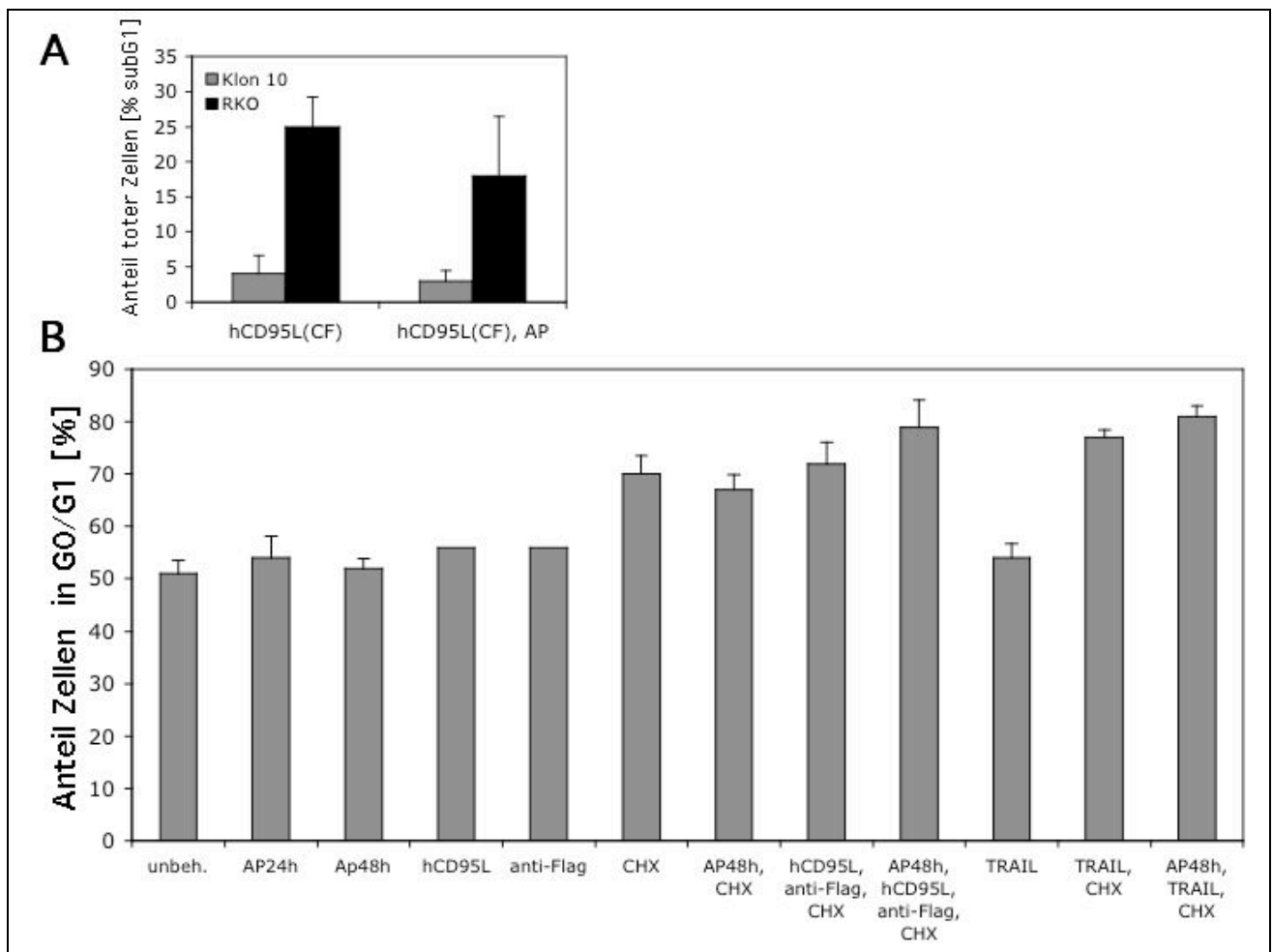


Abb. 3.25 Charakterisierung der RKO10-Zellen

A: RKO10-Zellen sind mit und ohne 25 nM AP 21967 (AP, 48h) gegenüber hCD95L (10 ng/ml, mit CHX und anti-Flag-Antikörper (CF), 24h) induzierter Apoptose resistent. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 unabhängigen Versuchen. **B:** Während der Induktor AP21967 (24h und 48h) im Zellklon RKO10 kaum zur funktionellen p27 Überexpression führte (nur ca. 50% der Zellen in der G₀/G₁-Phase), hatte die Zugabe von CHX (24h) einen deutlichen Effekt auf den prozentualen Anteil

der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase. Wurden die RKO10-Zellen mit AP21967 in Kombination mit hCD95L (24h), anti-Flag-Antikörper und CHX oder TRAIL (10 ng/ml, 24h + CHX) inkubiert, hatte dies einen G0/G1-Arrest von 79% der Zellen zur Folge. Dies wurde im FACS anhand der PI-Färbung der Proben ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.3 „p27-neu“-Genexpressionssystem (*ARIAD*)

Keiner der untersuchten Klone des „All-in-one“ Systems erwies sich nach zwei bis drei Passagen noch als induzierbar. Daher wurde zur Etablierung des p27-ARIAD-Systems in RKO-Zellen nun auf die klassische Zwei-Vektoren-Strategie zurückgegriffen, d.h. die zwei Komponenten des Systems; der artifizielle Transkriptionsfaktor und die p27-Zielgen-Kassette, wurden in zwei separaten retroviralen Vektoren nacheinander in die RKO-Zellen eingebracht (= „p27-neu“). Doch auch diese Strategie führte nicht zum Erfolg: Keiner der erhaltenen Klone ließ sich zur p27-Überexpression induzieren (Daten nicht gezeigt).

3.3 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen nach transienter Transfektion von p27- und p21-cDNA

3.3.1 Transiente Transfektion der RKO-Zellen

Eine weitere Möglichkeit, die Zellzyklusabhängigkeit der durch hCD95L ausgelösten Apoptose zu untersuchen, ist die Transfektion mit einem für p27 kodierenden Plasmid zur transienten Überexpression des CDK-Inhibitors. Da das für die Transfektion verwendete p27 mit EGFP fusioniert war, konnte die Expression anhand der grünen Fluoreszenz leicht überprüft werden. In der anschließenden Analyse im Durchflußzytometer wurde das Zellzyklusprofil der grün fluoreszierenden im Vergleich zur GFP-negativen Population ausgewertet. Zur Kontrolle wurden RKO-Zellen mit EGFP cDNA (ohne p27-Anteil) transfiziert. In Abb. 3.26 ist das Ergebnis eines solchen Experimentes dargestellt. Hierbei zeigte sich weder mit p27EGFP (Abb. 3.26 A) noch mit EGFP alleine (Abb. 3.26 B) ein Unterschied im Apoptoseverhalten der EGFP-positiven und der EGFP-negativen Populationen. Dabei befanden sich 71% der p27EGFP-positiven Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase, im Vergleich zu 49% der EGFP-negativen Zellen. In Abb 3.26 B wurden zusätzlich nicht transfizierte Kontrollzellen mit hCD95L, anti-Flag-Antikörper und CHX zur Apoptoseinduktion behandelt. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Apoptoseinduktion in transfizierten Zellen erwartungsgemäß kein Unterschied.

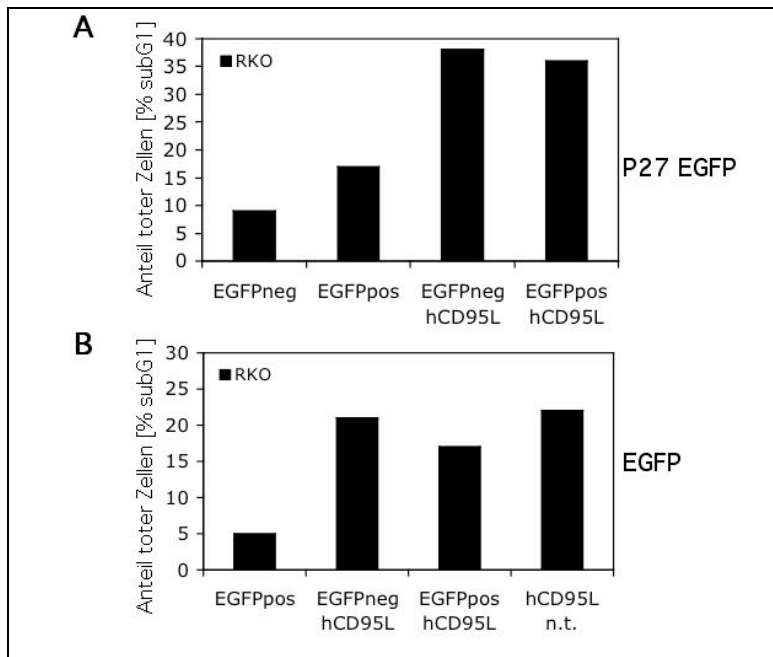


Abb. 3.26

Kein Einfluss einer transienten p27-Expression in RKO-Zellen auf die CD95-vermittelte Apoptose

A: Transiente Transfektion der RKO-Zellen mit p27EGFP-cDNA. Erfasst wurden die EGFP-positiven sowie negativen Zellen im subG1-Bereich des mit PI gemessenen Zellzyklusprofils. Zusätzlich wurde mit 20 ng/ml hCD95L (plus anti-Flag-AK und CHX) für 5h Apoptose ausgelöst. **B:** Transiente Transfektion der RKO-Zellen mit EGFP-cDNA. Die EGFP-Expression beeinflusste nicht das Apoptoseverhalten der RKO-Zellen als Antwort auf hCD95L-Behandlung. Die genomische DNA der lebenden Zellen wurde mit dem zellpermeablen Farbstoff DRAQ angefärbt und die Zellzyklusverteilung der EGFP-positiven und negativen Zellpopulationen analysiert.

n.t.: nicht transfiziert

Eine Zusammenfassung aller transienten Transfektionsexperimente in RKO-Zellen ist in Abb. 3.27 abgebildet. Verglichen wurde das Apoptoseverhalten nicht transfizierter (WT) mit *EGFP*-, *p21EGFP*- und *p27EGFP*-cDNA transfizierten Zellen. Apoptose wurde jeweils durch die Zugabe von hCD95L mit anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid ausgelöst. Es zeigte sich, dass *EGFP*-transfizierte Zellen eine basale Apoptoserate ohne apoptotischen Stimulus von $8 \pm 6\%$ aufwiesen und als Reaktion auf die Zugabe von hCD95L mit anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid $26 \pm 11\%$ starben. Dies ist vergleichbar mit den nicht transfizierten Wildtypzellen ($34 \pm 10\%$ in subG1). Anders verhielten sich dagegen *p21EGFP*-transfizierte RKO-Zellen. Die Überexpression des CDK-Inhibitors p21 führte hier alleine schon zur Apoptose. Durchschnittlich starben durch die p21-Expression $35 \pm 4\%$ der Zellen, was durch die Zugabe von hCD95L auf $50 \pm 6\%$ gesteigert wurde. Die Transfektion mit *p27* führte zu spontaner Apoptose von $16 \pm 6\%$ der Zellen. Wurde in diesen Zellen zusätzlich Apoptose ausgelöst, starben $35 \pm 19\%$, was vergleichbar war mit der Apoptoserate nicht transfizierter RKO-Zellen ($34 \pm 10\%$ in subG1). Die Überexpression von p27 hatte somit keinen erkennbaren Effekt auf die durch hCD95L ausgelöste Apoptose.

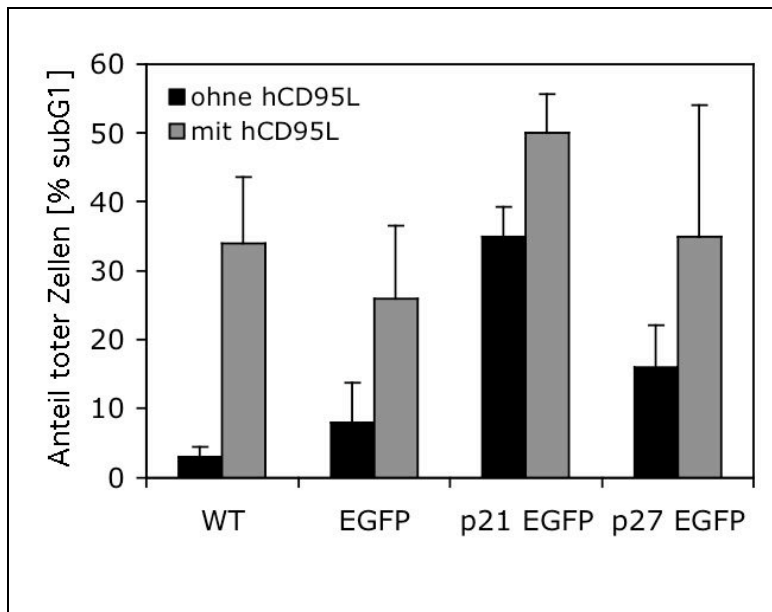


Abb. 3.27

Eine transiente p21- und p27- Überexpression inhibiert nicht die todesrezeptorvermittelte Apoptose in RKO-Zellen

Im Vergleich mit nicht transfizierten (WT) RKO-Zellen, zeigten EGFP- oder p27EGFP-exprimierende Zellen keine Beeinflussung der CD95-vermittelten Apoptose. p21-EGFP-exprimierende Zellen zeigten eine spontane Apoptoserate von 35%, die sich mit hCD95L, anti-Flag-Antikörper und CHX auf 50% steigern ließ. Analysiert wurden EGFP-positive Zellen, indem nur die im FL1-Kanal des Durchflußzytometers grün fluoreszierenden Zellen berücksichtigt wurden. Das Zellzyklusprofil wurde mithilfe des zellpermeablen DNA-Farbstoffes DRAQ im FL3-Kanal erfasst. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.3.2 Transiente Transfektion der 293T-Zellen

Da sich RKO-Zellen nur sehr schlecht transfizieren ließen (die durchschnittliche Transfektionseffizienz betrug 10%), wurden in weiteren Experimenten gut transfizierbare HEK 293T-Zellen benutzt. Wieder starben durch alleinige Transfektion mit *p21*-cDNA $47 \pm 13\%$ der Zellen, und nach Zugabe von TRAIL und CHX sogar $59 \pm 9\%$ der transfizierten Zellen. Die Überexpression von p27 beeinflusste die durch TRAIL ausgelöste Apoptose in 293T-Zellen nicht (Daten nicht gezeigt; die Messung erfolgte mithilfe eines spezifischen Caspase-Substrates der Firma *Promega*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Transfektionsstudien die Überexpression von p27 keinen Einfluss auf die todesrezeptorvermittelte Apoptose hatte. Die Überexpression des CDK-Inhibitors p21 hingegen führte bereits alleine zu einem Anstieg der Apoptoserate, die nach Aktivierung des Todesrezeptorsignalweges noch verstärkt wurde.

3.4 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen unter Verwendung verschiedener Zellzyklussynchronisationsmethoden

3.4.1 Synchronisation verschiedener Zelllinien durch Serumentzug

Um mit anderen Systemen und Methoden zu untersuchen, ob eine Zellzyklusabhängigkeit der CD95-vermittelten Apoptose besteht, werden in diesem Abschnitt Experimente beschrieben, in denen durch Entzug essentieller Wachstumsfaktoren Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase arretiert wurden. Diese synchronisierte Zellpopulation wurde anschließend nach Austausch des Mediums erneut in

serumreichem Milieu (10% FKS) wieder zur Proliferation angetrieben, wobei der Hauptteil dieser Zellpopulation die nächsten Phasen des Zellzyklus annähernd synchron durchlaufen sollte. Zunächst wurde mit dieser Methode versucht, RKO-Zellen zu synchronisieren. Dazu wurde Medium mit reduziertem Gehalt an FKS (0-5%) benutzt (Abb. 3.28 A). Der DNA-Gehalt der Zellen wurde nach viertägiger Kultivierung in serumreduziertem Medium mithilfe der Propidiumiodidanfärbung fixierter Zellen gemessen. Im Vergleich zu Zellen, die ständig in 10% FKS-haltigem Kontrollmedium gehalten wurden, war erkennbar, dass sich die RKO-Zellen nach Serumentzug vermehrt in G0/G1 sammelten. Doch selbst eine Kultivierung in serumfreiem Medium (0%FKS) arretierte nur 60% der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Wurde nach dem dritten Tag serumfreier Kultivierung Apoptose durch die Zugabe von 10 ng/ml hCD95L mit anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid in 10% FKS-haltigem Medium ausgelöst, zeigte sich nach 24 Stunden, dass nun ein leicht höherer Anteil der Zellen (58%) starb im Vergleich mit den Kontrollzellen (10% FKS; Abb. 3.28 B). Die mit 0,1% FKS arretierten Zellen wiesen eine der proliferierenden Kontrollpopulation entsprechende Apoptoserate auf (50%). Es war bei diesen Versuchen eine drei- bis viertägige Kultivierungszeit in serumreduziertem Medium gewählt worden, da nach ein bis zwei Tagen noch keine Ansammlung der RKO-Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase zu erkennen war. RKO-Zellen eigneten sich offensichtlich nicht zur Synchronisation durch Serumentzug, da zum einen selbst nach vier Tagen sich nur 60% der Zellen in der G0/G1-Phase befanden und zum anderen nach erneutem Zugeben von serumreichem Medium die Zellen nicht synchron in den Zellzyklus eintraten, sondern sich nach kürzester Zeit über alle Zellzyklusphasen verteilt hatten (Abb. 3.28 B: G0/G1 24h).

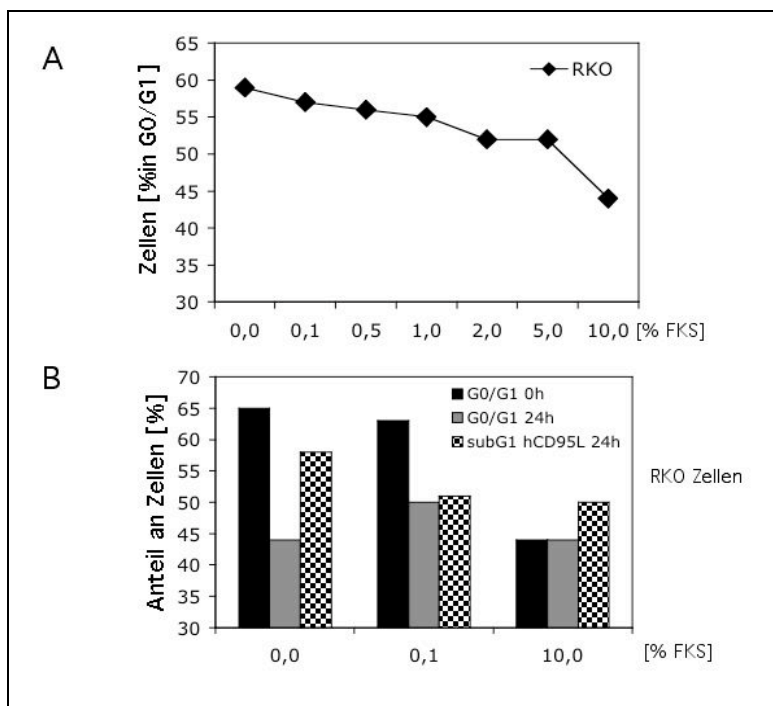


Abb. 3.28

Synchronisation der RKO-Zellen in G0/G1 durch Serumentzug

A: Anteil der RKO-Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus nach 4-tägiger Kultivierung in Medium mit 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 5 und 10% FKS. Je geringer der Anteil an FKS, desto mehr Zellen sammelten sich in G0/G1, maximal jedoch 60% der Zellen. **B:** Anteil der RKO-Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase nach dreitägiger Kultivierung in 0, 0,1 und 10% FKS-haltigem Medium sowie nach weiteren 24h in serumreichem Medium (10%). Es wurde zusätzlich der Anteil an toten Zellen ermittelt, die 24h in nährstoffhaltigem Medium mit hCD95L kultiviert wurden. Es zeigte sich kein Unterschied im Apoptoseverhalten der in 0,1% oder 10% FKS vorkultivierten RKO-Zellen. Eine Kultivierung in 0% FKS-Medium erhöhte die Apoptoserate, ohne den G0/G1-Arrest zu verstärken.

In weiteren Experimenten wurden arrestauslösende Substanzen (Daidzein, Mimosin, Aphidicholin, Genistein und Nocodazol) verwendet, um RKO-Zellen zu synchronisieren. Aufgrund der starken Eigeneffekte der Substanzen, wurde dieser Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde untersucht, ob sich CHO-Zellen besser für diese Analysen eigneten. Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden in Medium mit reduziertem FKS Gehalt (0,5%) kultiviert. Die anschließende Analyse der PI-gefärbten Zellen im Durchflußzytometer ergab, dass sich nach dieser Behandlung ca. 60-70% der Zellen in der G0/G1-Phase befanden (unbehandelte CHO-Zellen befinden sich zu 45-50% in der G0/G1-Phase). Es wurde diese relativ kurze Zeit des Serumentzugs gewählt, da nach 48 Stunden in serumreduziertem Medium bereits apoptotische CHO-Zellen detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurde auch eine FKS-Konzentration von 0,5% statt 0% benutzt. Nach dem Serumentzug wurde das Medium wieder mit serumreichem (10% FKS) Zellkulturmedium ausgetauscht und nach 16, 19, 22 und 24 Stunden die Zellen geerntet und mithilfe der Propidiumiodidanfärbung das Zellzyklusprofil der Proben analysiert (Abb. 3.29). Anhand der gemessenen Zeitwerte war zu erkennen, dass die CHO-Zellen nach Serumzugabe wieder anfangen, synchron den Zellzyklus zu durchlaufen. Nach 16 Stunden befand sich schon ein hoher Anteil (48%) der Zellpopulation in der G2/M-Phase; nach 19 Stunden waren nur noch 16% der Zellen in G0/G1 nachweisbar und der Rest verteilte sich zu 23% auf die S- und zu 51% auf die G2/M-Phase. Nach 24 Stunden hatten sich die CHO-Zellen wieder über alle Phasen des Zellzyklus verteilt, d.h. die durch den Serumentzug bedingte Synchronisation war wieder aufgehoben. Somit ließen sich CHO-Zellen zwar durch Serumentzug in der G0/G1-Phase arretieren, doch ist der aufgrund der relativ kurzen Serumentzugszeit niedrige Anteil von 60-70% der Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase nicht ausreichend für zellzyklusabhängige Apoptoseuntersuchungen.

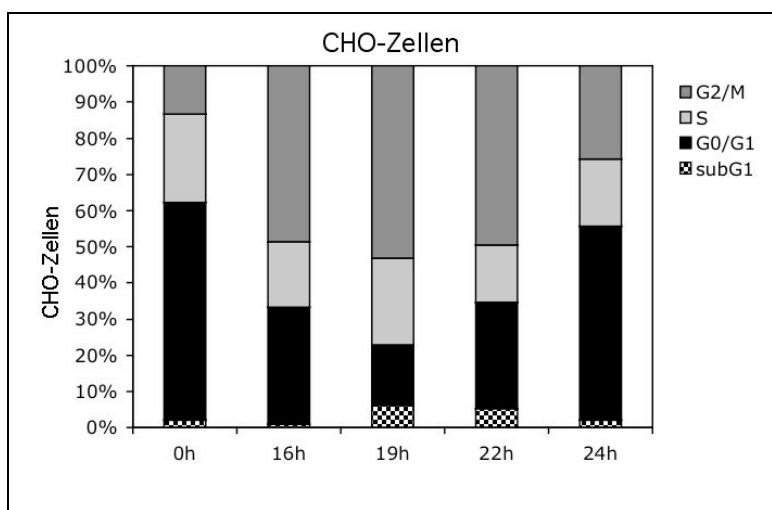


Abb. 3.29

Synchronisation von CHO-Zellen durch reduzierten Serumgehalt

CHO-Zellen wurden für 24 Stunden in serumreduziertem Medium kultiviert (0,5% FKS). Danach wurde wieder vollständiges Medium (10% FKS) zugegeben, und nach 0h, 16h, 19h, 22h und 24h wurden die Zellen für eine Zellzyklusanalyse geerntet. Dargestellt ist (über eine Messung des Gehalts an mit PI gefärbter DNA) der jeweilige Prozentsatz an Zellen in den Phasen G0/G1, S, G2/M sowie an apoptotischen Zellen (subG1). Gezeigt wird der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Somit wurde das Zellsystem ein weiteres Mal gewechselt, und es wurden NIH 3T3-Zellen (Mausfibroblasten) verwendet. Diese Zellen ließen sich in serumfreiem Medium bereits nach 24 Stunden zu 80-90% in der G0/G1-Zellzyklusphase arretieren (unbehandelte, proliferierende NIH 3T3-Zellen befanden sich zu 45-50% in der G0/G1-Phase). Anschließend wurde das serumfreie gegen serumhaltiges (10% FKS) Medium ausgetauscht, und nach 0, 15, 16, 18, 20 bzw. 24 Stunden wurden die Zellen für eine Zellzyklusanalyse geerntet (Abb. 3.30). 16 Stunden nach Serumzugabe befand sich der Hauptanteil der Zellen in der S-Phase ($48\pm 2\%$) des Zellzyklus, 18 Stunden danach in der S- ($38\pm 0\%$) und G2/M-Phase ($32\pm 4\%$), und 20 Stunden nach Zugabe von 10% FKS-Medium befanden sich 46% der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. 24 Stunden nach Serumgabe verteilten sich die NIH 3T3-Zellen zu $50\pm 7\%$ auf die G0/G1-, $14\pm 2\%$ auf die S- und $27\pm 4\%$ auf die G2/M-Phase.

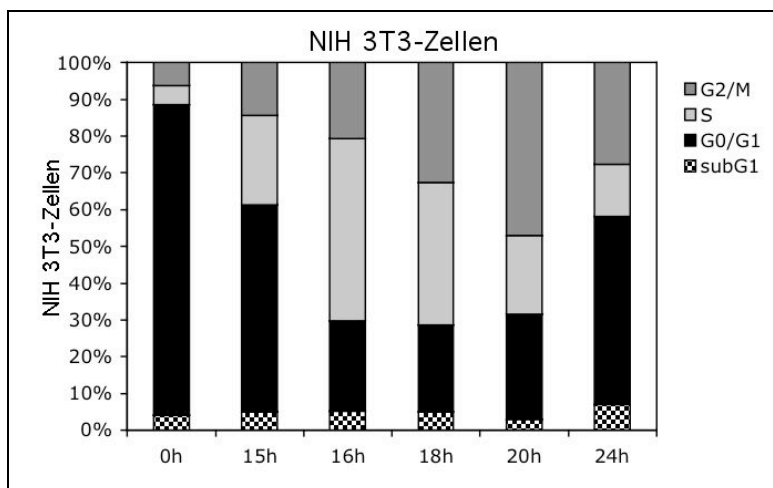


Abb. 3.30

Synchronisierung von NIH3T3-Mauszellen durch Serumentzug

NIH 3T3-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert (0% FKS). Danach wurde dieses mit vollständigem Medium (10% FKS) ausgetauscht, und nach 0h, 15h, 16h, 18h, 20h bzw. 24h wurden die Zellen zur Zellzyklusanalyse geerntet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der mit PI gefärbten Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S, G2/M sowie subG1. Die in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretierten Zellen befanden sich nach 16h hauptsächlich in der S- und nach 20h in der G2/M-Phase.

Da sich NIH 3T3-Zellen für die Synchronisation nach Serumentzug in der G0/G1-Phase des Zellzyklus als optimal erwiesen hatten, wurden diese Zellen benutzt, um ihr Apoptoseverhalten zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen erneut für 24 Stunden serumfrei kultiviert, bevor FKS zugegeben und 2 Stunden vor der Analyse des jeweiligen Zeitwertes Apoptose mit 100 ng/ml hCD95L plus anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid ausgelöst wurde. Zu keinem Zeitpunkt zeigten die NIH 3T3-Zellen eine Sensitivität gegenüber hCD95L-ausgelöster Apoptose (Abb. 3.31). Dies ist umso erstaunlicher, als nicht synchronisierte, exponentiell wachsende NIH 3T3-Zellen durchaus CD95-sensitiv waren: ca. 30% der Zellen wurden nach Inkubation mit 20 ng/ml hCD95L (+CHX, anti-Flag-Antikörper) getötet (Abb. 3.53).

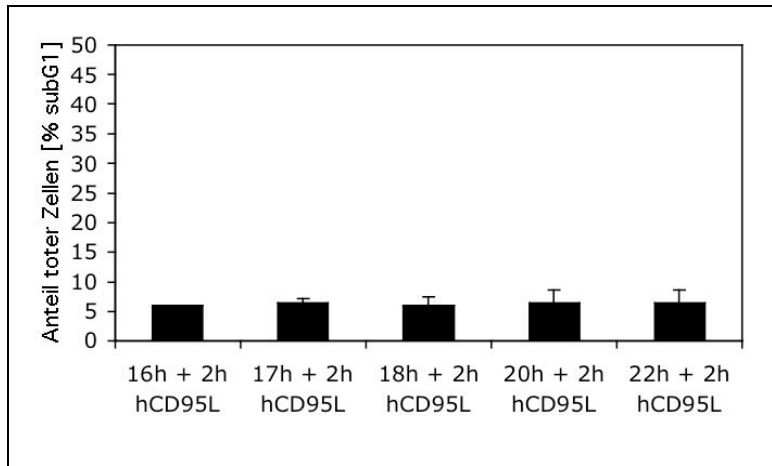


Abb. 3.31

Apoptoseresistenz synchronisierter NIH 3T3-Zellen gegenüber CD95-vermitteltem Zelltod

Dargestellt ist der Anteil apoptotischer NIH 3T3-Zellen mit hypoploiden DNA-Gehalt nach Synchronisation durch Serumentzug und zweistündiger Behandlung mit 100 ng/ml hCD95L mit anti-Flag-Antikörper und CHX. Die Zellen wurden zuvor durch Kultivierung in serumfreiem Medium für 24 Stunden in der G0/G1-Phase arretiert; anschließend wurde mit serumreichem Medium (10% FKS) ausgetauscht. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.4.2 Einfluss der Apoptoseinduktion auf die Zellzyklusverteilung der überlebenden RKO-Zellen

In einem weiteren Experiment wurden die Verteilungen der für 24 Stunden mit hCD95L, anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid, sowie der nur mit Cycloheximid (CHX) behandelten und lebenden RKO-Zellen (unb.) analysiert. Es fällt auf, dass es durch die Cycloheximid Behandlung und auch durch die Behandlung mit hCD95L, anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid (hCD95L) zu einer Anreicherung in der G0/G1-Phase kam (jeweils ca. 60% der Zellen in G0/G1, Abb. 3.32).

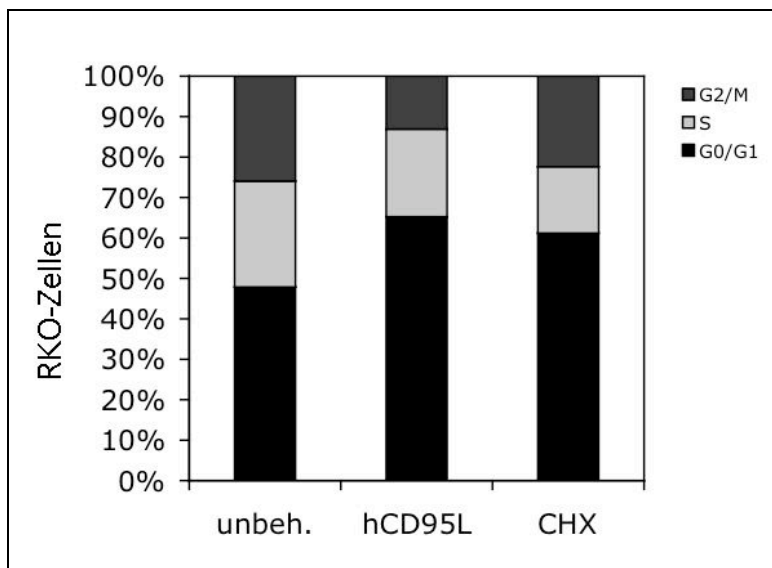


Abb. 3.32

CD95-induzierte Apoptose führt zu einer Ansammlung der überlebenden RKO-Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase

Die mit 10 ng/ml hCD95L, 1 µg/ml anti-Flag-AK und 100 ng/ml CHX (hCD95L) sowie die nur mit CHX behandelten Zellen (CHX) wiesen eine Erhöhung des Zellanteils in der G1-Phase auf im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzellpopulation (unb.). Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die PI-gefärbten Proben im Durchflußzytometer analysiert.

Aufgrund der Beobachtung, dass die Stimulation der RKO-Zellen mit hCD95L, CHX und anti-Flag-Antikörper zu einer Ansammlung der überlebenden Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase führte, wurde die Veränderung der Zellzyklusverteilung nach Auslösung CD95-vermittelter Apoptose näher untersucht. Dazu wurden eine Konzentrationsreihe sowie eine Zeitkinetik aufgenommen (Abb. 3.33).

Je mehr hCD95L für 24 Stunden zugegeben wurde, desto geringer war der Anteil der überlebenden Zellen in der G2/M-Phase, während der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase von 48% (0 ng/ml) auf 55% (50 ng/ml) anstieg (Daten nicht gezeigt). Die mit dem hCD95-Liganden zugegebene Cycloheximidkonzentration wurde konstant gehalten (Abb. 3.33 A). Die Zeitkinetik in Abb. 3.33 B veranschaulicht, dass dieser Effekt (niedrigerer Anteil in der G2/M-Phase) erst nach längerer Stimulation auftrat. Erst 8 Stunden nach Zugabe des Todesliganden (mit CHX und anti-Flag-Antikörper) waren eine Erhöhung der G0/G1-Phasenpopulation und eine Verringerung der G2/M-Population im Vergleich zu unbehandelten RKO-Zellen erkennbar. In beiden Experimenten führte die Stimulation der CD95-vermittelten Apoptosekaskade in den jeweils überlebenden Zellen zu einer Erhöhung der G0/G1-Population, was auf eine Protektion in der G0/G1-Zellzyklusphase hinweist.

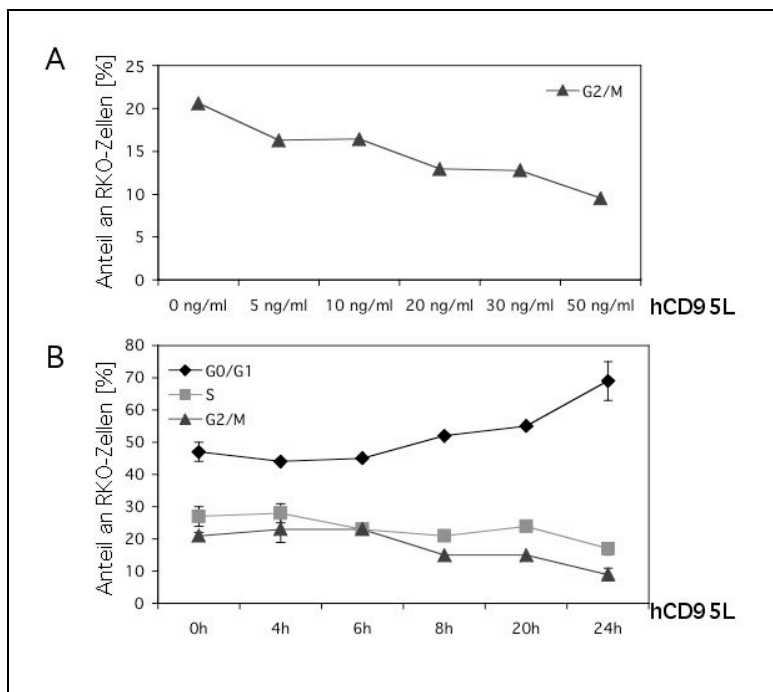


Abb. 3.33

Zellzyklusverteilung überlebender Zellen in Abhängigkeit von der hCD95L-Konzentration und -Inkubationszeit

A: Aufgetragen ist der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase in Abhängigkeit von der hCD95L-Konzentration (0-50 ng/ml für 24 h mit 1 μ g/ml anti-Flag-Antikörper und 100 ng/ml CHX). Mit ansteigender hCD95L-Konzentration und damit mit Anstieg der Apoptoserate, sank der Anteil der lebenden Zellen in der G2/M-Phase. **B:** Aufgetragen ist die Zellzyklusverteilung der überlebenden RKO-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit hCD95L (0h, 4h, 6h, 8h, 20h, 24h: 10 ng/ml hCD95L mit anti-Flag-Antikörper und CHX). Nach 24h befanden sich fast 70% der lebenden Zellen in der G0/G1-Phase.

Der Anteil der toten Zellen, gemessen im sub-G1-Bereich, stieg mit erhöhter hCD95L-Konzentration stetig an (Tab. 3.4). Der Anteil der toten Zellen stieg mit zunehmender Inkubationszeit erst an und fiel dann wieder etwas ab (Tab. 3.4).

hCD95L Konzentration	% in subG1	hCD95L Inkubationszeit	% in subG1
0 ng/ml	3	0h	3
5 ng/ml	14	4h	37
10 ng/ml	27	6h	44
20 ng/ml	46	8h	67
30 ng/ml	53	20h	45
50 ng/ml	58	24h	52

Tab. 3.4: Anteil an RKO-Zellen im subG1-Bereich nach hCD95L-Behandlung

Mit ansteigender hCD95L-Konzentration starben mehr Zellen (subG1-Bereich). Mit längerer hCD95L-Inkubationszeit starben bis zum Erreichen des 8h-Wertes zunehmend mehr RKO-Zellen (Maximum bei 67%).

3.5 Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen proliferierender RKO-Zellen

3.5.1 Simultane Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen durch Caspase-3/7-AAD-Anfärbung

In den vorigen Experimenten wurde das Apoptoseverhalten einer zuvor arretierten Zellpopulation untersucht. In diesem Abschnitt werden nun Versuche beschrieben, in denen das Apoptoseverhalten proliferierender, nicht zellzyklusarretierter RKO-Zellen untersucht wurde. Dazu wurden simultan nach Auslösung der CD95-Kaskade aktive Caspase-3 (mit einem Antikörper, der ausschließlich aktive Caspase-3 detektiert) und die Zellzyklusverteilung über 7-AAD-Anfärbung im FACS aufgenommen. In der anschließenden Analyse wurde die Zellzyklusverteilung der anti-Caspase-3-PE-positiven mit der Zellzyklusverteilung der anti-Caspase-3-PE-negativen Population verglichen (Abb. 3.34). Dabei zeigte sich, dass der Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase in der Caspase-3-negativen Population über einen Zeitraum von 24 Stunden annähernd gleich blieb (ca. 50%). Während dieser Anteil in der Caspase-3-positiven Population zu Beginn der hCD95L-Behandlung wesentlich niedriger war, dann etwas anstieg, aber nach 6 Stunden wieder abfiel und generell immer unter 50% blieb. Entsprechend war der Anteil an Zellen mit aktiver Caspase-3 sowohl in der S-, als auch in der G2/M-Phase im Vergleich zur Caspase-3-negativen Population erhöht. Beim 0 Stunden-Wert bleibt zu beachten, dass hier nur ca. 2000 Zellen der 200 000 gemessenen Ereignisse Caspase-3-Aktivität besaßen (1% der Zellen apoptotisch).

hCD95L Inkubationszeit	% Caspase-3 positiv
0h	1
2h	10
6h	35
16h	36
22h	35
24h	15

Tab. 3.5: Anteil an Caspase-3-positiven RKO-Zellen nach hCD95L-Behandlung

Mit länger andauernder Inkubationszeit mit 10 ng/ml hCD95L (plus CHX, anti-Flag-AK) stieg der Anteil an Caspase-3-positiven Zellen an (Maximum 36%) und fiel nach 24h wieder auf 15% ab. Möglicherweise werden mit zunehmender Dauer apoptotische Zellen vermehrt durch Phagozytose beseitigt.

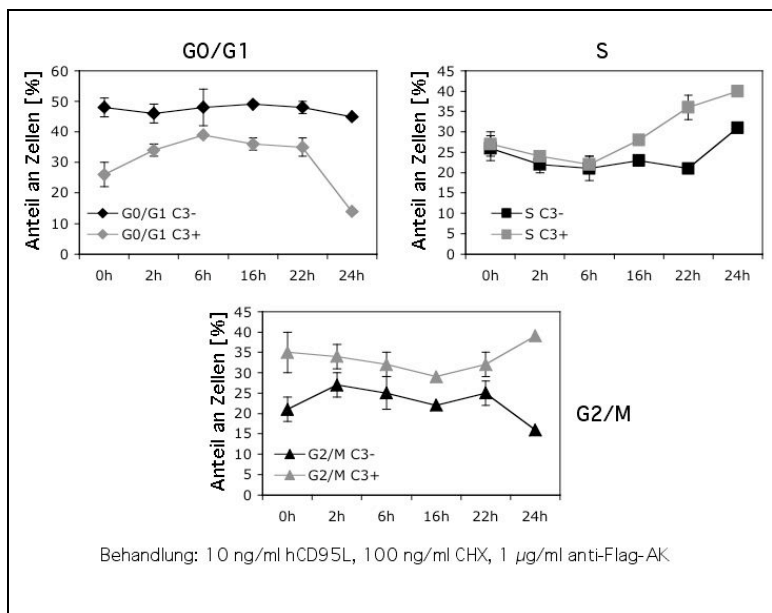


Abb. 3.34

Geringerer Anteil Caspase-3-aktiver RKO-Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase nach hCD95L-Behandlung

Es wurde jeweils der Anteil an Zellen in den G0/G1-, S- oder G2/M-Phasen Caspase-3-aktiver (apoptotischer) sowie Caspase-3-inaktiver (lebender) Populationen untersucht. Apoptose wurde durch die Inkubation der Zellen mit 10 ng/ml hCD95L, 100 ng/ml CHX und 1 µg/ml anti-Flag-AK ausgelöst. Während Zellen mit Caspase-3-Aktivität zu einem geringeren Anteil in G0/G1 nachweisbar waren, stieg der Anteil dieser Zellen in der S- und G2/M-Phase an. Die Caspase-3-Aktivität wurde durch Inkubation der permeabilisierten Zellen mit einem anti-Caspase-3-PE-AK bestimmt. Die Zellzyklusverteilung wurde anhand der 7-AAD-Färbung ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie bereits in Abb. 3.32 zu sehen war, konnte die Ansammlung der Zellen in der G0/G1-Phase durchaus alleine durch die Zugabe von Cycloheximid bedingt sein. Um dies näher zu untersuchen, wurde im nächsten Experiment Apoptose durch die Zugabe von 50 ng/ml hCD95L ohne Zusatz von Cycloheximid ausgelöst (Abb. 3.35). Apoptotische Zellen, die über Aktivierung des CD95-Rezeptors getötet wurden (Caspase-3 positiv), unterschieden sich offensichtlich in ihrer Zellzyklusverteilung von lebenden (Caspase-3 negativen) Zellen, denn sie befanden sich vermehrt in den aktiven S/G2/M-Zellzyklusphasen. Dies bestätigte sich auch, wenn hCD95L ohne Cycloheximid für die Apoptoseinduktion zu den RKO-Zellen gegeben wurde.

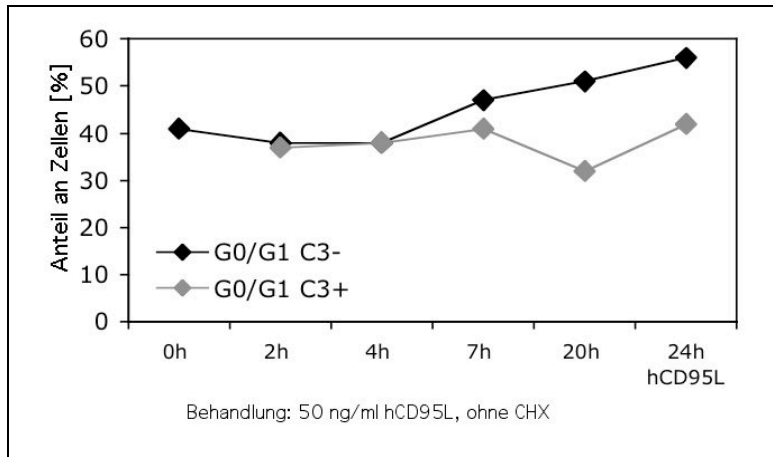


Abb. 3.35

Zellzyklusverteilung apoptotischer RKO-Zellen nach hCD95L-Behandlung ohne CHX

Aufgetragen ist jeweils der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase in den Caspase-3-aktiven sowie inaktiven Zellpopulationen. Zur Caspase-3-Aktivierung wurden 50 ng/ml hCD95L mit anti-Flag-Antikörper (jedoch ohne CHX) zu den Zellen gegeben. Caspase-3-positive RKO-Zellen wiesen einen geringeren Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase auf. Die permeabilisierten RKO-Zellen wurden mit anti-Caspase-3-PE-AK und 7-AAD inkubiert.

3.5.2 Untersuchungen zur Cyclin-Expression in apoptotischen RKO-Zellen

Cycline werden – ihrem Namen entsprechend - im Verlauf des Zellzyklus periodisch exprimiert (vgl. 1.2.2). Diese Eigenschaft wurde im Folgenden genutzt, um Unterschiede in der Apoptosesensitivität von RKO-Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen (mit unterschiedlicher Cyclin-Expression) aufzuzeigen. Cycline besitzen eine relativ kurze Halbwertszeit und ihr Expressionslevel erreicht in einer bestimmten Phase des Zellzyklus ein Maximum.

Cyclin B wird am Ende der S-Phase, mit einem Maximum in der G2-Phase, exprimiert. Im Komplex mit CDC2 kontrolliert es den Übergang der Zelle in der G2/M-Phase. Am Ende der Mitose wird es ubiquitinvermittelt durch das Proteasom abgebaut. Cyclin E dagegen reguliert den Übergang von der G1- in die S-Phase. Die Expression von Cyclin E beginnt in der Mitte der G1-Phase und erreicht ein Maximum in der S-Phase. Die Cyclin D3-Expression bleibt im Verlauf des Zellzyklus relativ konstant (vgl. Einleitung, Abb. 1.9).

Die intrazelluläre Anfärbung der Cycline in Relation zum Zellzyklusprofil ergab für proliferierende RKO-Zellen die in Abb. 3.36 dargestellte Verteilung, wobei bei dieser Analyse der Messbereich nicht eingegrenzt wurde. Daher ergab die Summe der %-Zahlen der einzelnen Zellzyklusphasen in diesem Fall 80% (statt 100%), da sich die restlichen 20% gleichmäßig und in allen Proben im gleichen Ausmaß über den DNA>4n-Bereich verteilten.

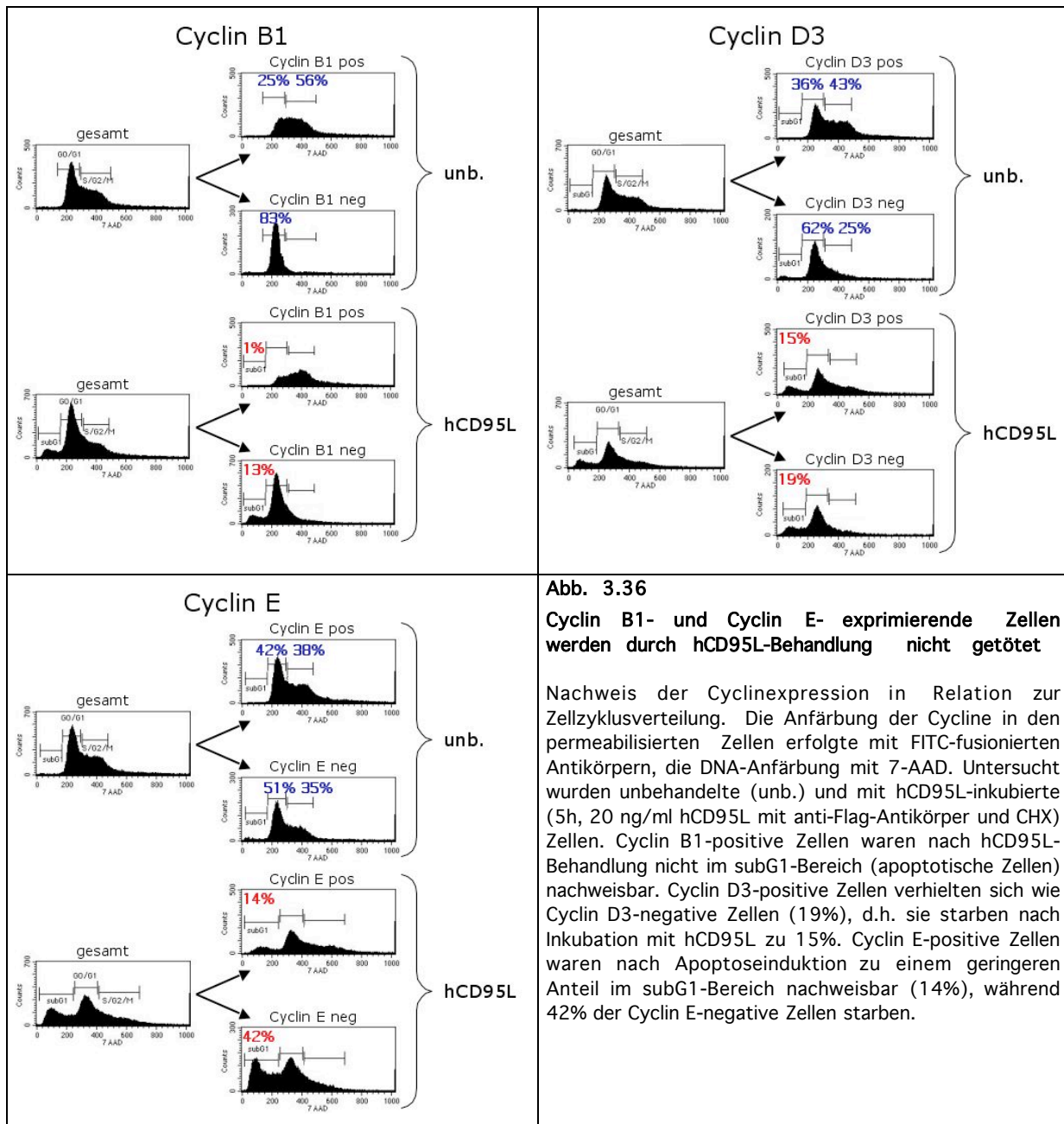


Abb. 3.36

Cyclin B1- und Cyclin E- exprimierende Zellen werden durch hCD95L-Behandlung nicht getötet

Nachweis der Cyclinexpression in Relation zur Zellzyklusverteilung. Die Anfärbung der Cycline in den permeabilisierten Zellen erfolgte mit FITC-fusionierten Antikörpern, die DNA-Anfärbung mit 7-AAD. Untersucht wurden unbehandelte (unb.) und mit hCD95L-inkubierte (5h, 20 ng/ml hCD95L mit anti-Flag-Antikörper und CHX) Zellen. Cyclin B1-positive Zellen waren nach hCD95L-Behandlung nicht im subG1-Bereich (apoptotische Zellen) nachweisbar. Cyclin D3-positive Zellen verhielten sich wie Cyclin D3-negative Zellen (19%), d.h. sie starben nach Inkubation mit hCD95L zu 15%. Cyclin E-positive Zellen waren nach Apoptoseinduktion zu einem geringeren Anteil im subG1-Bereich nachweisbar (14%), während 42% der Cyclin E-negative Zellen starben.

Unbehandelte Cyclin B1-exprimierende Zellen verteilten sich folgendermaßen auf die Zellzyklusphasen (Abb. 3.36): 25% in G0/G1 und 56% in S/G2/M. Dementsprechend befanden sich die Cyclin B-negativen Zellen zu 83% in G0/G1. Nach Apoptoseinduktion war nur 1% der Cyclin B1-exprimierenden Zellen im subG1-Bereich nachweisbar im Gegensatz zu 13% der Cyclin B1-negativen Population. 36% der Cyclin D3-exprimierenden unbehandelten Zellen befanden sich in G0/G1 und 43% in S/G2/M, während 62% der Cyclin D3-negativen Zellen in G0/G1 und nur 25% in S/G2/M nachweisbar waren. Wurde hCD95L-induzierte Apoptose ausgelöst, starben 15% der Cyclin D3-positiven und 19% der Cyclin D3-negativen Zellpopulation. Cyclin E-exprimierende Zellen zeichneten sich durch folgende Verteilung aus: 42% der Zellen wurden in der G0/G1-Phase und 38% in den

S/G2/M-Phasen detektiert. Bei den Cyclin E-negativen Zellen befanden sich dagegen 51% in G0/G1 und 35% in S/G2/M. Nur 14% der Cyclin E-positiven Population starben nach Aktivierung der CD95-Apoptosekaskade, aber dafür 42% der Cyclin E-negativen Population.

Alle Cyclin-Expressionsexperimente sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass sich der Anteil Cyclin B1- und Cyclin E-positiver Zellen nach hCD95L-Behandlung in der apoptotischen Zellpopulation vermindert hatte, nicht jedoch der Anteil Cyclin D3-positiver Zellen.

Cyclin	unbehandelt		hCD95L		hCD95L	
	positiv, gesamt	negativ, gesamt	positiv, gesamt	negativ, gesamt	apoptotisch und positiv	apoptotisch und negativ
B1	54 ±12 %	38 ±10 %	45 ±14 %	52 ±13 %	4 ±5 %	14 ±10 %
D3	84 ±18 %	13 ±17 %	79 ±13 %	18 ±9 %	17 ±11 %	17 ±11 %
E	57 ±21 %	41 ±20 %	31 ±14 %	65 ±13 %	8 ±10 %	29 ±20 %

Tab. 3.6: Expression der Cycline in RKO-Zellen

Die Behandlung mit 10 ng/ml hCD95L plus anti-Flag-Antikörper und CHX für 24h führte zu einer Verringerung des Anteils an Cyclin B1- und Cyclin E-positiven, aber nicht an Cyclin D3-positiven Zellen. Zudem waren die Cycline B1 und E kaum in apoptotischen Zellen nachweisbar, dafür jedoch Cyclin D3. Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

3.6 Zelldichte und Mediumverbrauch beeinflussen das Apoptoseverhalten von RKO-Zellen

3.6.1 Untersuchung der CD95-vermittelten Apoptose dicht gewachsener und mit konditioniertem Medium behandelte RKO-Zellen

Mit der Dichtearretierung (Kontaktinhibition) wurde eine weitere Methode gewählt, um zellzyklusarretierte, nicht proliferierende RKO-Zellen in ihrem Apoptoseverhalten ohne Nebeneffekte untersuchen zu können. Ein wichtiger Vorteil dieser Methode war, dass für die Beeinflussung des Zellzyklus keine weiteren Substanzen oder Induktoren benötigt wurden. RKO-Zellen ließen sich mit dieser Methode zu ca. 70% in der G0/G1-Phase arretieren (Abb. 3.37). Wurde nun die CD95-Apoptosekaskade initiiert, starben in der dünn ausgesäten („dünn“: 1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte) proliferierenden Kontrollpopulation 21% der Zellen, in der dichtearretierten Population („dicht“: 2×10^6 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte) dagegen nur 5% der Zellen.

Interessanterweise hatte die Zufuhr des von dichten Zellen über Nacht (16h) konditionierten Mediums (Mk) zu dünn ausgesäten Zellen deren Protektion gegenüber den eingesetzten apoptoseauslösenden Substanzen (20 ng/ml hCD95L plus 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper und 100 ng/ml Cycloheximid) zur Folge. Es starben nur 12% dieser „dünnen“ mit konditioniertem Medium behandelte Zellen, die

ansonsten eine normale Zellzyklusverteilung proliferierender Zellen aufwiesen. Vor Zugabe des konditionierten Mediums zu dünn ausgesäten Zellen, wurden Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation und Filtration (0,45µm Filter) entfernt. Die Inkubation mit konditioniertem Medium betrug auch bei allen nachfolgenden Experimenten jeweils 16 Stunden.

Des Weiteren veränderte sich die Morphologie der Zellen, zu denen der Kulturüberstand konfluenter Zellen gegeben wurde: die Zellen rundeten sich ab, verloren ihre Adhärenz (Abb.3.37, Pfeile) während die nicht abgelösten Zellen sich vernetzten (Abb. 3.37). Da die Zellzyklusverteilung weder einen höheren Anteil an Zellen in der subG1- noch in der G2/M-Phase aufwies, handelte es sich hierbei nicht um apoptotische oder mitotische Zellen, die sich bekanntermaßen ebenfalls ablösen und abrunden.

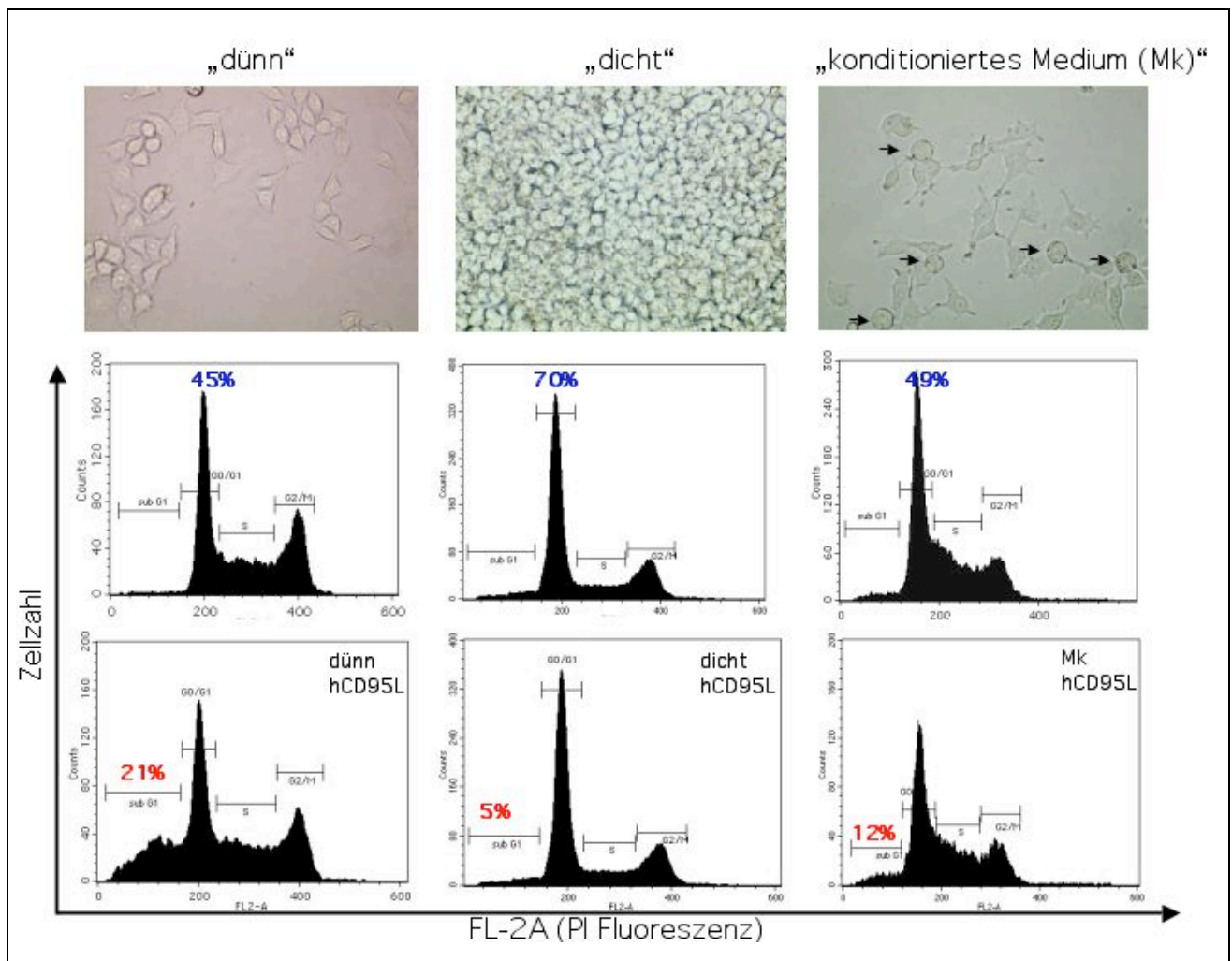


Abb. 3.37 Zelldichte und konditioniertes Medium beeinflussen die Morphologie und hemmen die Apoptose von RKO-Zellen

„Dünn“ ausgesäte RKO-Zellen (1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte) zeichneten sich durch unregelmäßige Zellform und Sensitivität gegenüber hCD95L-induzierter Apoptose (21% in subG1) aus. Dicht ausgesäte Zellen (2×10^6 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte) waren kugelförmig. Diese Zellen starben nicht mehr nach hCD95L-Behandlung (5h

20 ng/ml mit 1 μ g/ml anti-Flag-Antikörper, 100 ng/ml CHX). RKO-Zellen, die mit dem konditionierten Medium (Mk) „dichter“ Zellpopulationen behandelt wurden, rundeten sich z.T. ab und verloren ihre Adhärenz (Pfeile) und wurden insensitive gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (12% in subG1). Es wurde das Zellzyklusprofil der Zellen anhand der PI-Färbung nach Fixierung im FACS bestimmt.

Das Diagramm in Abbildung 3.38 veranschaulicht die Zusammenfassung sechs unabhängiger Apoptoseexperimente. Die Zugabe von hCD95L mit anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid führte zur Apoptose von $25\pm 6\%$ der proliferierenden Kontrollzellen, die im subG1-Bereich des Zellzyklusprofils detektiert wurden. Mit konditioniertem RKO-Medium behandelte RKO-Zellen (Mk) starben im Mittel zu $5\pm 1\%$ und dicht ausgesäte Zellen zu $10\pm 1\%$.

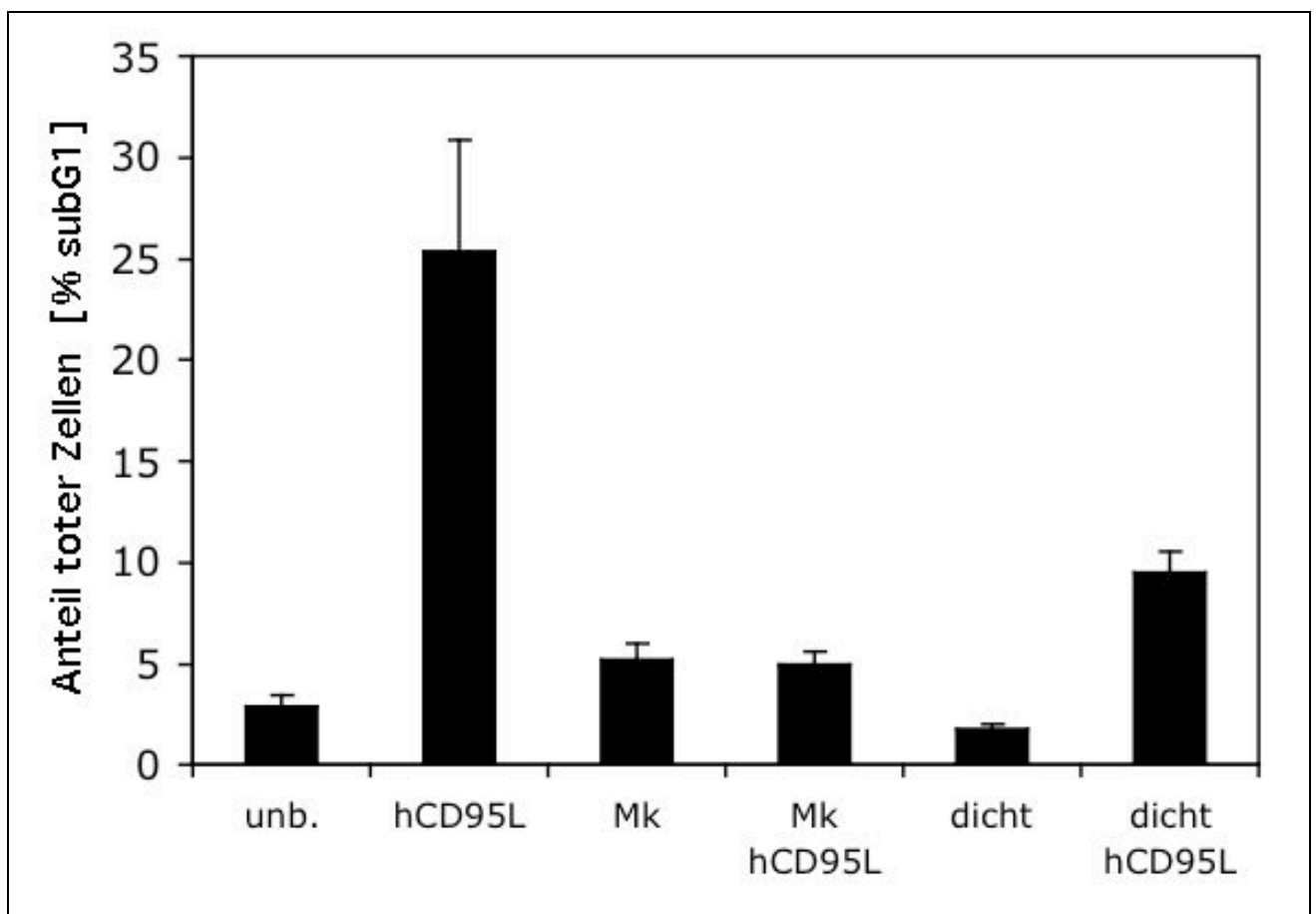


Abb. 3.38 Dichtearretierung und RKO-konditioniertes Medium (Mk) hemmen die CD95-vermittelte Apoptose in RKO-Zellen

Eine PI-Färbung der fixierten und permeabilisierten RKO-Zellen zeigte, dass dünn ausgesäte und mit konditioniertem Überstand konfluenter RKO-Zellen („Mk“, 16h) behandelte Zellen nur zu 5% nach hCD95L-Inkubation starben. Im Vergleich dazu starben 25% der mit 20 ng/ml hCD95L (plus 1 μ g/ml anti-Flag-AK und 100 ng/ml CHX) für 5h behandelten dünn ausgesäten Kontrollzellen. Bei dicht ausgesäten Zellen starben 10% durch hCD95L-Behandlung. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Versuchen.

3.6.2 Auswirkungen des konditionierten Mediums auf das Proliferationsverhalten der RKO-Zellen

In Abbildung 3.37 zeigten dünn ausgesäte und mit Mk-behandelte Zellen eine Zellzyklusverteilung wie normal proliferierende RKO-Zellen. Um dies genauer zu analysieren, wurde in den verschiedenen RKO-Zellpopulationen der Anteil an Zellen in der S-Phase mit einem anti-BrdU-FITC-Antikörper im Durchflußzytometer bestimmt (Abb. 3.39). Hierbei zeigte sich, dass dünn ausgesäte und mit Mk-behandelte Zellen mit 23% BrdU-positiven Zellen zwar mehr DNA-synthetisierende Zellen aufwiesen als dichtearretierte Zellen (10%), aber weniger als die proliferierende Kontrollpopulation (54%). Die Zugabe von zusätzlichen 10% FKS zum konditionierten Medium förderte nicht wesentlich den Anteil proliferierender Zellen (27% BrdU-positive Zellen). Die Behandlung mit konditioniertem (und damit auch Nährstoff-verbrauchtem) Medium führte zu verringerter Proliferation dünn ausgesäter RKO-Zellen, was sich auch durch Zugabe von frischem FKS nicht änderte.

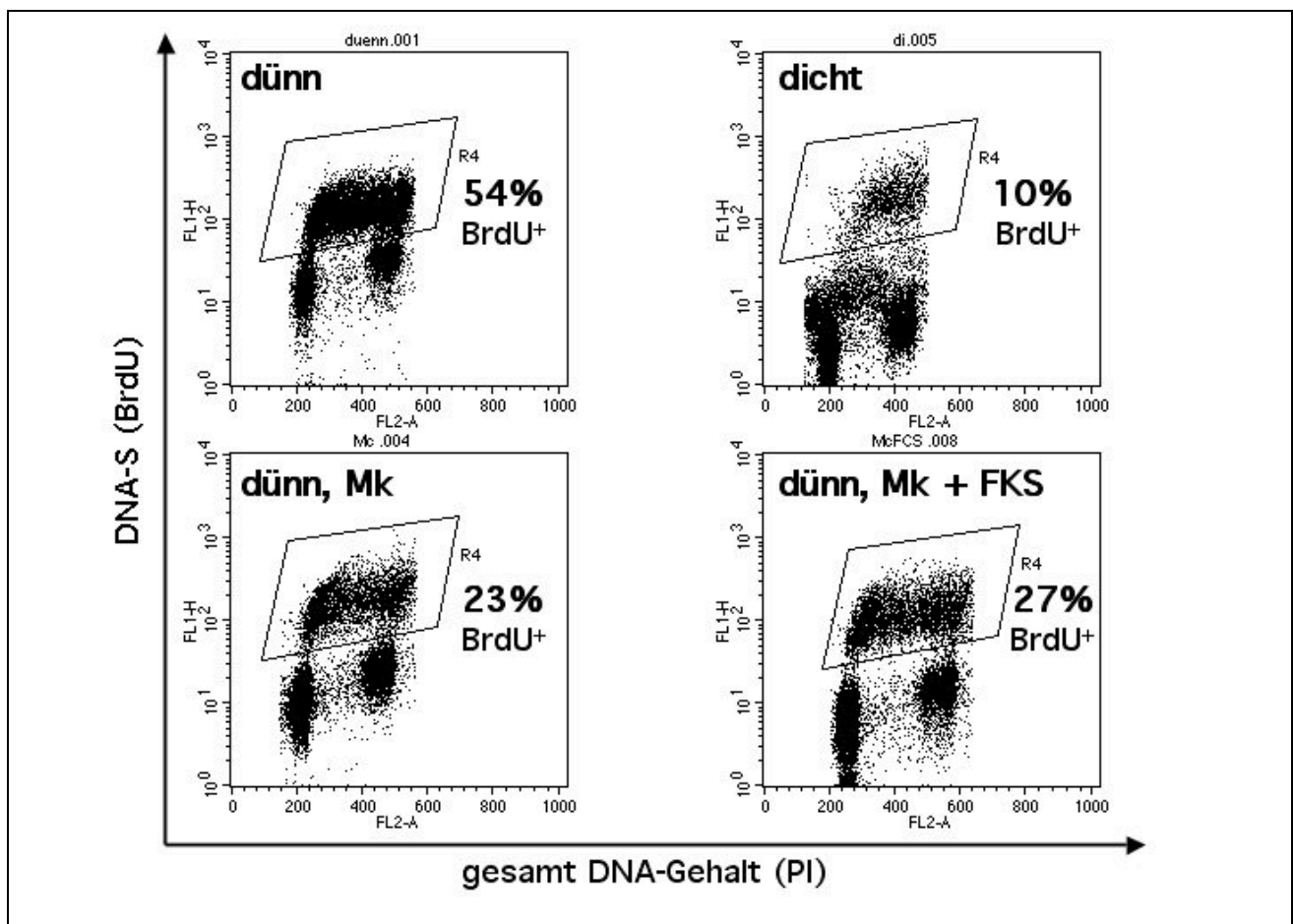


Abb. 3.39 Konfluenz und konditioniertes Medium von dichtgewachsenen Zellen verlangsamen die Proliferation der RKO-Zellen

Durch Quantifizierung der BrdU-Inkorporation mit anti-BrdU-FITC-AK wurde der Anteil an proliferierenden Zellen zusammen mit der Zellzyklusverteilung (PI) ermittelt. „Dünne“ Kontrollzellen hatten nach einer 1,5-stündigen Inkubation mit BrdU zu 54% BrdU eingebaut; 10% der „dichten“ und 23% der für 16h mit „Mk“ behandelten dünnen Zellpopulation waren BrdU-

positiv. Die sofortige Zugabe von zusätzlichen 10% FKS führte zu einem BrdU-Einbau in 27% der Zellen in „Mk-behandelten“ dünn ausgesäten Zellen.

3.6.3 Expression des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche der dicht und dünn gewachsenen RKO-Zellen

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, auf welcher Ebene der CD95-vermittelten Apoptose in dicht gewachsenen und in dünn ausgesäten Zellen, die mit konditioniertem Medium behandelt wurden, der Zelltod inhibiert wird.

Dazu wurde zunächst überprüft, ob sich die CD95-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche der RKO-Zellen signifikant geändert hatte. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.40 gezeigt und verdeutlicht, dass weder eine erhöhte Zelldichte noch konditioniertes RKO-Medium die CD95-Oberflächenexpression beeinflussten.

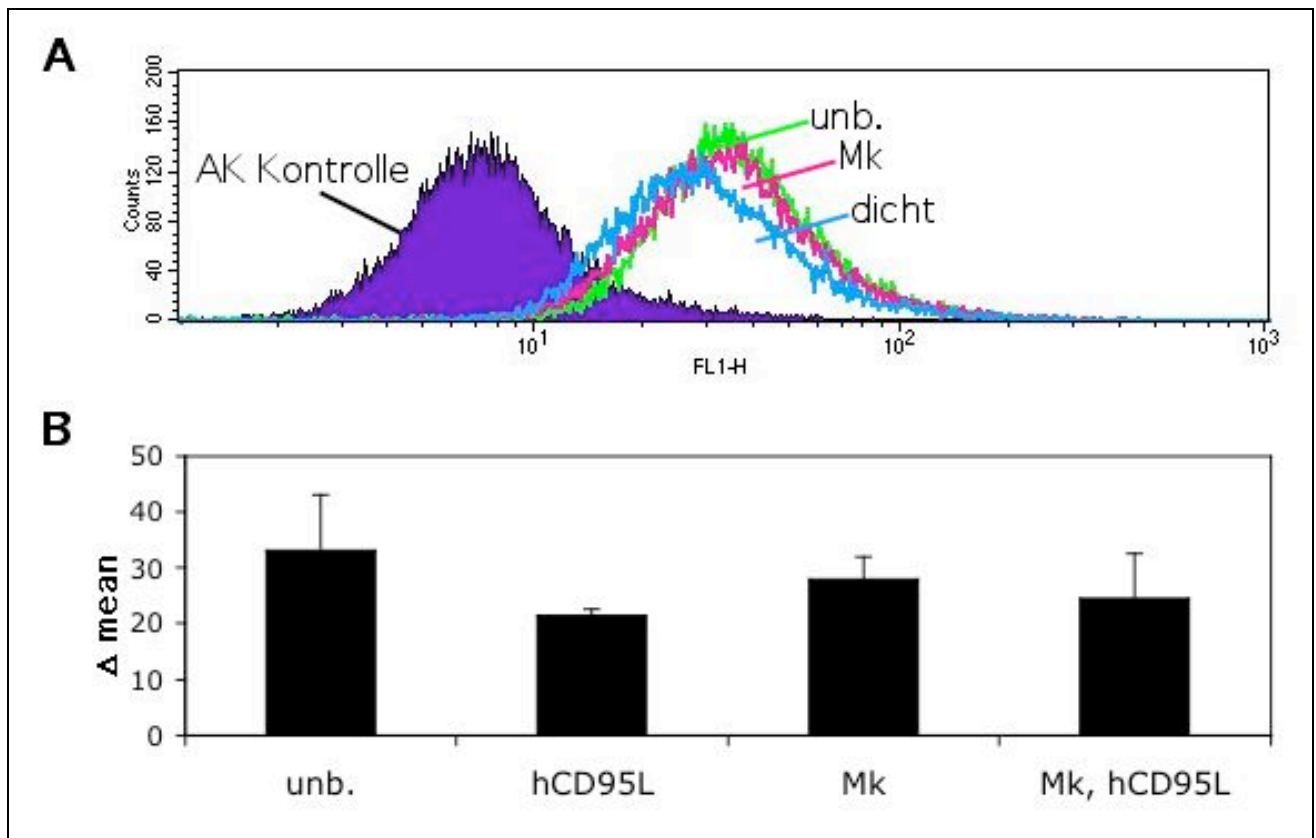


Abb. 3.40
Die CD95-Expression an der Zelloberfläche der RKO-Zellen bleibt unbeeinflusst durch unterschiedliche Zelldichte oder die Zugabe konditionierten Mediums

Die durchflußzytometrische Analyse der CD95-Expression auf der Zelloberfläche mit einem anti-CD95-FITC Antikörper ergab keine signifikanten Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen den Zuständen „dünn“, „dicht“ und mit konditioniertem Medium („Mk“) behandelten dünn ausgesäten Zellen. **A:** „Overlay“ der Fluoreszenzmessung der unbehandelten (unb.), Mk-behandelten (Mk, 16h) und dicht ausgesäten Zellen (dicht). Zur Kontrolle wurden die Proben zusätzlich mit anti-IgG-FITC-AK analysiert (AK-Kontrolle). **B:** Unbehandelte und Mk-behandelte (16h) Zellen wurden zur Apoptoseinduktion für 5h mit 20 ng/ml hCD95L (plus 1 μ g/ml anti-Flag-AK und 100 ng/ml CHX) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit

anti-CD95-FITC-AK für die Rezeptoranalyse gefärbt. Δ mean repräsentiert die Differenz aus der mit anti-CD95-FITC-AK und aus der mit dem Kontrollantikörper (anti-IgG-FITC) gemessenen Fluoreszenz. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten.

3.6.4 Rekrutierung von FADD und Caspase-8 in den CD95-DISC der dünn und dicht gewachsenen RKO-Zellen nach CD95-Aktivierung

Als nächstes stellte sich die Frage, ob es nach CD95-Rezeptoraktivierung mit hCD95L und anti-Flag-Antikörper zur DISC-Bildung in den unterschiedlich apoptosesensitiven Zellpopulationen kam. Um dies herauszufinden, wurde der Rezeptorkomplex mitsamt den assoziierten Signalmolekülen (DISC) aus dem Gesamtzellextrakt nach hCD95L-Behandlung präzipitiert und untersucht. In Abbildung 3.41 ist zu sehen, dass Caspase-8 und FADD im Gesamtzellsat der „dichten“ sowie der „dünnen“ Zellen vorhanden waren (Spur 1-4). In der nicht mit hCD95L stimulierten Negativkontrolle wurden weder Caspase-8 noch FADD zum Rezeptorkomplex rekrutiert (Spur 5 und 6). Mit hCD95L-stimulierte dünn ausgesäte („dünn“) und dicht ausgesäte („dicht“) Zellen rekrutierten diese Signalmoleküle in ihren CD95-DISC (Spur 7 und 8).

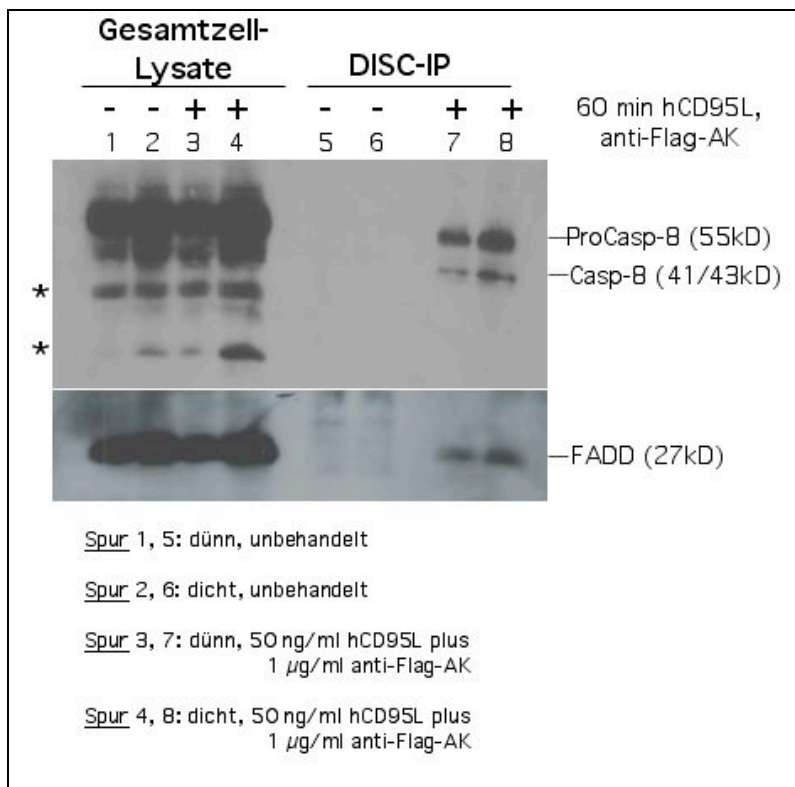


Abb. 3.41

Kein Unterschied in der CD95-DISC-Zusammensetzung nach Rezeptoraktivierung in dicht und dünn ausgesäten RKO-Zellen

Zur DISC-Analyse wurden das jeweilige Gesamtzelllysate (Spur 1-4) sowie das erhaltene Präzipitat (Spur 5-8) in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend in einer Western Blot-Analyse auf Caspase-8 und FADD Rekrutierung hin untersucht. Proben der nicht mit hCD95L und anti-Flag-Antikörper behandelten Zellen sind jeweils in der Spur 1, 2, 5 und 6 aufgetragen, während die Proben der für 1h mit 50 ng/ml hCD95L plus 1 µg/ml anti-Flag-AK behandelten Zellen in den Spuren 3, 4, 7 und 8 aufgetragen wurde. Präzipitiert wurde der Komplex mit Protein A-Sepharose-„beads“, die an den anti-Flag-AK binden.

*: unspezifische Banden

3.6.5 Untersuchung der Caspase-8-Aktivität

Da die DISC-Immunopräzipitationen gezeigt hatten, dass Caspase-8 im gleichen Ausmaß in den DISC-Komplex unterschiedlich konfluenter Zellpopulationen rekrutiert wurde (Abb. 3.41), sollte anschließend untersucht werden, wieviel Caspase-8-Aktivität in dünn und dicht gewachsenen sowie in proliferierenden, mit konditioniertem Medium behandelten Zellen nach hCD95L-Behandlung nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden Caspase-8-Aktivitätsstudien durchgeführt (Abb. 3.42), indem die entsprechenden Zellysate mit einem spezifischen Caspase-8-Substrat versetzt wurden, welches nach Spaltung fluoreszierend wird. Es zeigte sich, dass kontakthinhibierte Zellen, aber auch mit konditioniertem Medium behandelte subkonfluente Zellen nach Stimulation mit hCD95L eine deutlich geringere Caspase-8-Aktivität (im Mittel ca. 12000 bzw. 15000 Units, Abb. 3.42) aufwiesen als unbehandelte dünn ausgesäte Kontrollzellen (im Mittel ca. 24000U). Somit wird das Apoptosesignal in den konfluenten und in den mit verbrauchtem Medium behandelten Zellen bereits auf Ebene der Caspase-8-Aktivierung inhibiert.

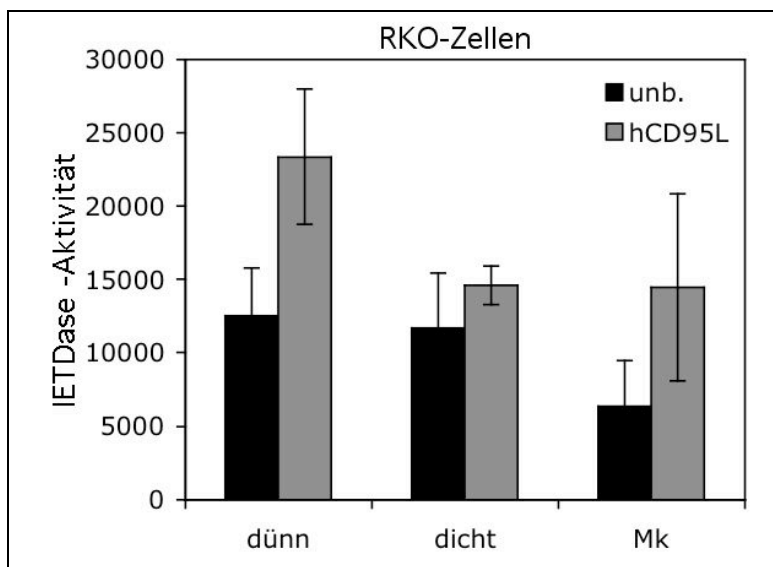


Abb. 3.42

Verminderte Caspase-8-Aktivität sowohl in dichtearretierten als auch in mit konditioniertem Medium (Mk) behandelten RKO-Zellen

Caspaseaktivität wurde anhand der Proteolyse des Caspase-8-spezifischen Substrates Ac-IETD-AFC erfasst, welches im gespaltenen Zustand fluoresziert. Die Zellen (dünn und dicht ausgesät sowie dünn ausgesät und für 16h mit Mk behandelt) wurden für 5h mit 20 ng/ml hCD95L, 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper und 100 ng/ml CHX behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.6.6 Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials

Im folgenden Experiment wurden mithilfe der JC-1-Anfärbung Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials erfasst. Bei normaler Membranpolarisierung bilden die JC-1-Moleküle Aggregate, die im FL2-Kanal detektierbar sind. Eine Membrandepolarisierung hingegen führt dazu, dass die JC-1-Moleküle in ihrer monomeren Form vorliegen, die eine in FL1 detektierbare Fluoreszenzausstrahlung aufweisen. Während die Kontrollzellpopulation subkonfluenter, nicht behandelter Zellen nach Inkubation mit hCD95L ein depolarisiertes mitochondriales Membranpotential aufwies, war kaum eine

Membrandepolarisierung in „dichten“ sowie subkonfluenten, mit konditioniertem Medium („Mk“) behandelten Zellen nachweisbar. Diese Zellpopulationen hielten ihr Membranpotential trotz hCD95L-Behandlung aufrecht (Abb. 3.43).

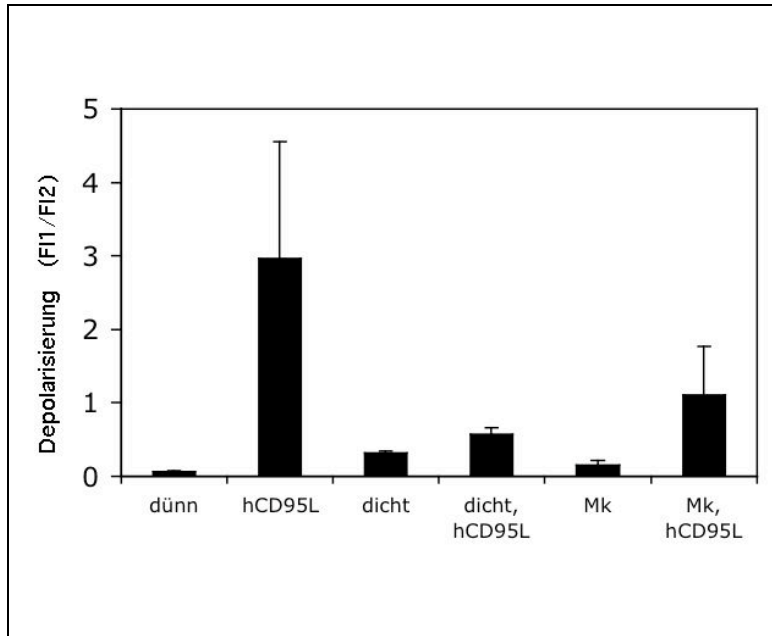


Abb. 3.43

Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$

Dünn ausgesäte („dünn“), konfluente („dicht“) und dünn ausgesäte, mit konditioniertem Medium („Mk“)-behandelte Zellen wurden für 5h mit 20 ng/ml hCD95L, 1 μ g/ml anti-Flag-Antikörper und 100 ng/ml CHX inkubiert. Während die „dünn“ Zellpopulation eine Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) aufwies (FL1/FL2 >1), waren die Membranen der „dichten“ und „Mk-behandelten“ Ansätze intakt (FL1/FL2 <1). Ermittelt wurde die Fluoreszenz des potentialabhängigen Farbstoffes JC-1. Bei aufrecht erhaltenem MMP bilden sich JC-1-Aggregate, deren Fluoreszenz im FL2-Kanal detektiert wurde, ansonsten (Depolarisierung) gibt es nur Monomere, die im FL1-Kanal detektiert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.6.7 Vergleich der Bcl-x_L-Proteinexpression

Im Zusammenhang mit den mitochondrialen Ereignissen wurde die Expression eines anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieds (Bcl-x_L) überprüft (Abb. 3.44). Bcl-x_L verhindert durch die Dimerisierung mit pro-apoptotischen Familienmitgliedern (z.B. Bax) die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien (Kirkin et al. 2004). „Dichte“, als auch durch Behandlung mit konditioniertem Medium abgelöste Zellen (abgelöste Zellen, „abgl.“) wiesen eine verstärkte Bcl-x_L-Expression im Vergleich zu unbehandelten dünnen Zellen auf. Mit konditioniertem Medium behandelte subkonfluente Zellen exprimierten ebenfalls mehr Bcl-x_L als unbehandelte dünn ausgesäte Zellen und zeigten im Gegensatz zu diesen keinen caspasevermittelten Abbau des Proteins nach Apoptoseinduktion.

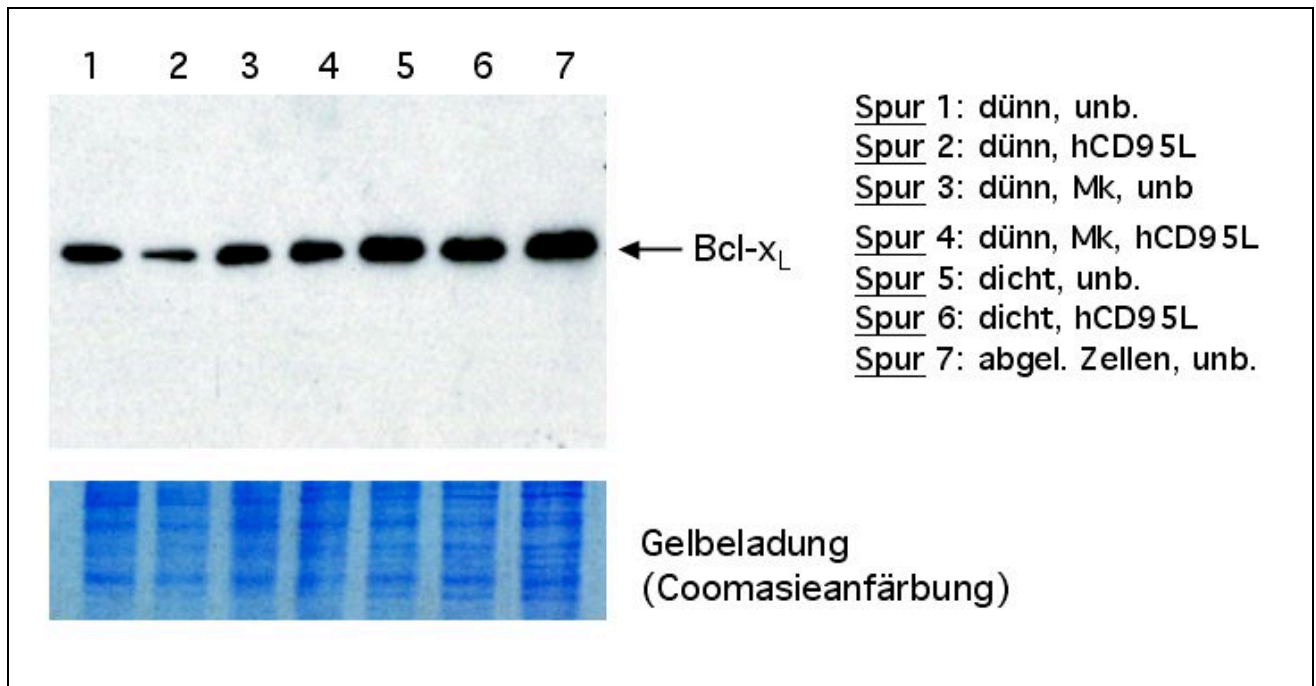


Abb. 3.44 Erhöhte Bcl-x_L-Expression sowohl in konfluenten als auch in dünn ausgesäten RKO-Zellen, die mit konditioniertem Medium behandelt wurden

Das Gesamtzelllysate „dünn“, „dicht“, mit konditioniertem Medium behandelte und dadurch abgelöste Zellen wurde auf seinen Bcl-x_L-Gehalt im Western Blot untersucht. Die einzelnen Proben waren mit oder ohne 20 ng/ml hCD95L (plus anti-Flag-Antikörper und CHX) über Nacht (16h) behandelt worden. Dieses Experiment wurde zweimal mit entsprechendem Ergebnis durchgeführt. Die Coomassieanfärbung des Gels zeigt die einheitliche Proteinbeladung an.

3.6.8 Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien nach CD95-Aktivierung

Ein wichtiges Ereignis des durch CD95L-ausgelösten Signaltransduktionsweges in TypII-Zellen ist die Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) aus den Mitochondrien in das Zytosol. Dies konnte mithilfe einer intrazellulären Cyt c-Anfärbung mit einem anti-Cytochrom c-Antikörper im FACS quantifiziert werden. In Übereinstimmung mit den vorher gewonnenen Ergebnissen kam es weder bei dichtearretierten noch bei dünn ausgesäten, mit konditioniertem Medium behandelten Zellen („Mk“) zur Cyt c-Freisetzung nach Stimulation mit hCD95L („Mk“, Abb. 3.45).

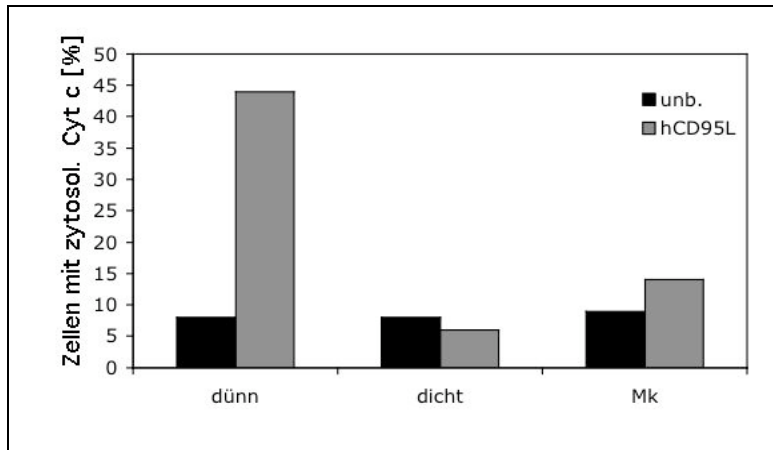


Abb. 3.45

Cytochrom c-Freisetzung aus RKO-Zellen nach hCD95L-Stimulus

Es wurde der Anteil an Cyt c-negativen Zellen (Cyt c freigesetzt) nach 5-stündiger Inkubation mit 20 ng/ml hCD95L (plus anti-Flag-AK und CHX) erfasst. 44% der „dünnen“ Zellpopulation besaßen kein mitochondriales Cyt c mehr. Dagegen setzten nur 6% der „dichten“ und nur 14% der dünn ausgesäten, „Mk-behandelten“ Zellen Cyt c aus den Mitochondrien frei.

3.6.9 Untersuchung der Caspase-3-Aktivität

RKO-Zellen können ohne ausreichende Caspase-8-Aktivität und ohne die mitochondriale Amplifizierung (MMP-Depolarisierung, Cyto c-Freisetzung) nach Stimulation mit hCD95L Caspase-3 nicht aktivieren. Wie in Abb. 3.46 zu sehen ist, wiesen sowohl dicht gewachsene als auch mit konditioniertem Medium behandelte subkonfluente Zellen folgerichtig nur eine sehr geringe Caspase-3-Aktivität auf (Abb. 3.46).

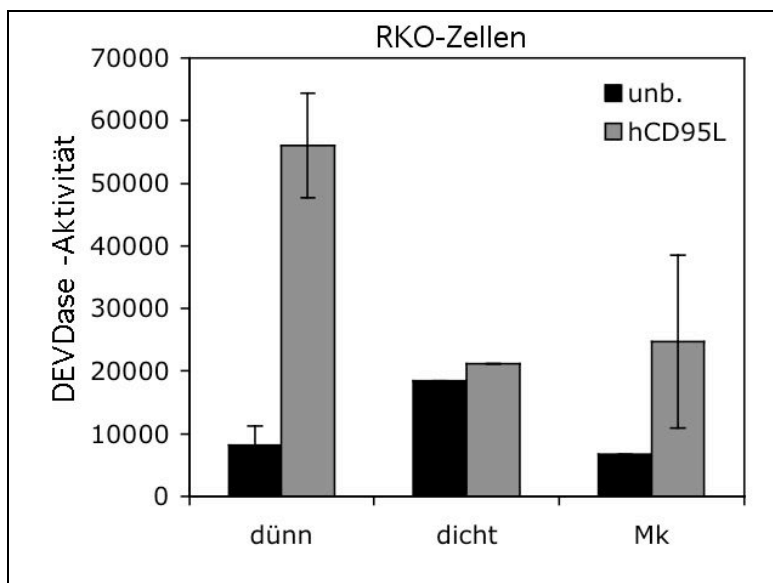


Abb. 3.46

Caspase-3-Aktivität in hCD95L-behandelten RKO-Zellen

Caspase-3-Aktivität wurde anhand der Spaltung des Substrates Ac-DEVD-AFC erfasst. Die Messung der Fluoreszenz (die nach Substratspaltung auftritt) ergab einen Anstieg der relativen Fluoreszenz der dünn ausgesäten und für 5h mit 20 ng/ml hCD95L (plus 1 µg/ml anti-Flag-AK und 100 ng/ml CHX) behandelten Population von 8090 relative Einheiten auf 56021. Dicht ausgesäte Zellen verzeichneten nur einen leichten Anstieg der gemessenen Fluoreszenz von 18512U auf 21157U. Mit konditioniertem Medium behandelte, dünn ausgesäte Zellen („Mk“) wiesen eine niedrige Grundaktivität auf (6640U), welche durch die Inkubation der Zellen mit hCD95L auf 24731U anstieg.

3.7 Weitere Analyse des anti-apoptotisch wirkenden konditionierten RKO-Überstands

3.7.1 Untersuchung zum biologisch wirksamen Bestandteil des konditionierten Mediums der RKO-Zellen

Um auszuschließen, dass nicht genügend hCD95L-Moleküle die dicht ausgesäten Zellen erreichten, da bei diesen schließlich 20 mal so viele Zellen ausgesät wurden als bei der dünn ausgesäten Kultur, wurde hCD95L im Überschuss zugegeben. Dichte Zellen ließen sich auch durch eine 3- und 6-stündige Inkubation mit 250 ng/ml und 500 ng/ml nicht in einem mit „dünnen“ Zellen vergleichbaren Prozentsatz in die Apoptose treiben (Abb. 3.47 A).

Um herauszufinden, ob dichte Zellpopulation ausschließlich durch den übermäßigen Verbrauch des zugeführten Zellkulturmediums gegenüber hCD95L induzierter Apoptose geschützt sind, wurde im nächsten Experiment das verbrauchte Medium während der Inkubation mit hCD95L, anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid mit frischem Medium, welches wieder hCD95L, anti-Flag-Antikörper und Cycloheximid enthielt, ausgetauscht. Dies wurde einmal (MW) oder zweimal (2xMW), jeweils mit und ohne PBS-Waschschritt (PMW), durchgeführt (Abb. 3.47 B). Dabei blieb die Protektion bestehen (7% in subG1), lediglich die Proben, bei denen das Medium zweimal gewechselt wurde, zeigten sich etwas sensitiver gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose (14% apoptotisch im Vergleich zu 45% der „dünnen“ Zellen).

Zudem zeigt das nächste Experiment (Abb. 3.47 C), dass eine sehr kurze Inkubationszeit (2h) der dünnen Zellen mit konditioniertem Medium genügte, um eine durch hCD95L ausgelöste Apoptose zu inhibieren. Während 20% der dünn ausgesäten Kontrollzellen ohne konditioniertes Medium durch diese Behandlung starben, waren nur 5% der für zwei Stunden mit konditioniertem Medium behandelten Zellen („2hMk“) apoptotisch. Dies veränderte sich kaum nach längeren Inkubationszeiten (4h, 6h, 24h).

Dicht ausgesäte Zellen veränderten bereits innerhalb von zwei Stunden ihr Medium so, dass es die durch hCD95L ausgelöste Apoptose abschwächte (Abb. 3.47 D). Während 40% der „dünnen“ Kontrollzellen starben, waren nur 28% der dünn ausgesäten Zellen, die mit einem für zwei Stunden konditioniertem Medium behandelt wurden, apoptotisch. Dies reduzierte sich nach einer 4-stündigen Konditionierung auf 24%, nach einer 6-stündigen Konditionierung auf 22% und mit Medium, das für 24 Stunden durch dichte RKO-Zellen konditioniert wurde, starben nur 3% der Zellen. Dies ließ vermuten, dass RKO-Zellen einen anti-apoptotisch wirkenden Faktor sekretierten, dessen Konzentration in dicht ausgesäten RKO-Zellkulturen naturgemäß höher als in dünn ausgesäten war.

Wurde das Medium abgewaschen, produzierten die Zellen erneut anti-apoptotisches Medium durch Faktorsekretion.

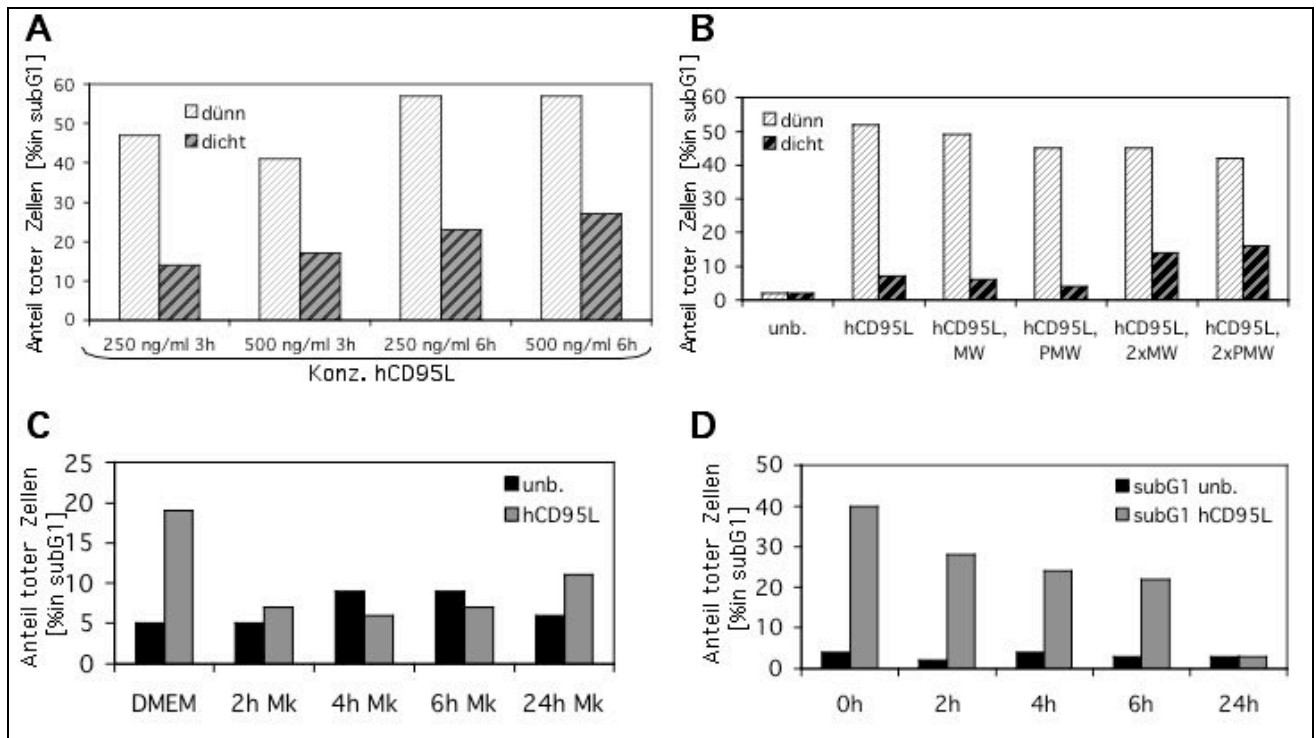


Abb. 3.47 RKO-Zellen produzieren einen anti-apoptotisch wirkenden Zellkulturüberstand

A: Die Apoptoseresistenz der dicht ausgesäten Zellpopulationen („dicht“) bestätigte sich auch nach Inkubation mit hohen hCD95L-Konzentrationen. So waren 47% der dünn ausgesäten Zellen („dünn“) nach einer 3-stündigen Behandlung mit 250 ng/ml hCD95L apoptotisch, aber nur 14% der „dichten“ Zellpopulation. Eine 3-stündige Inkubation mit 500 ng/ml hCD95L führte zum Zelltod von 41% „dünnen“ Zellen, aber nur 17% „dichten“ Zellen. Die 6-stündige Inkubation mit 250 ng/ml hCD95L löste in 57% der „dünnen“ Zellen Apoptose aus, jedoch nur in 23% der „dichten“ Zellen. Auch eine 6-stündige Behandlung mit 500 ng/ml hCD95L brachte 57% der „dünnen“ Zellen zum Sterben, aber lediglich 27% der „dichten“ Zellpopulation. **B:** Ein Mediumswechsel, einmal (MW) oder zweimal (2xMW) durchgeführt, mit und ohne PBS-Waschschritt (PMW) hob die Blockade der CD95-vermittelten Apoptose (10 ng/ml, 8h) der „dichten“ Zellen nicht auf. **C:** Das konditionierte Medium konfluenten RKO-Zellen („Mk“) protektionierte schon nach einer 2-stündigen Inkubation auf dünn ausgesäten RKO-Zellen. Apoptose wurde dabei jeweils die letzten 2 Stunden durch die Zugabe von 50 ng/ml hCD95L plus anti-Flag-AK und CHX ausgelöst. **D:** „Dichte“ Zellen produzierten schon nach 2h einen anti-apoptotisch wirkenden Zellkulturüberstand. Je länger dicht ausgesäte Zellen kultiviert wurden, desto protektiver wirkte ihr Überstand. Es wurde dabei mit 10 ng/ml hCD95L über Nacht (16h) plus anti-Flag-AK und CHX inkubiert. Der Anteil an Zellen im subG1-Bereich eines mit PI-Färbung bestimmten Zellzyklusprofils wurde im FACS analysiert.

Da RKO-Zellen offensichtlich einen anti-apoptotischen Faktor in überstehendes Medium sekretieren, wurde mit einem Zytokinarray der Firma *Ray Biotech* versucht, ob ein bekanntes Zytokin im konditionierten Medium von konfluenten Zellen nachzuweisen war (vgl. Abb. 2.3 S. 72).

Hierzu wurden die mit Antikörpern beladenen Membranen mit den Zellkulturüberständen dünn ausgesäter sowie dicht gewachsener Zellen inkubiert. Das verbrauchte Medium konfluenten RKO-Zellen enthielt erhöhte Mengen an IL-8, Angiogenin und evtl. an Onkostatin M (OSM; Abb. 3.48 A) sowie LIF, PIGF und IGFBP-2 (Abb. 3.48 B).

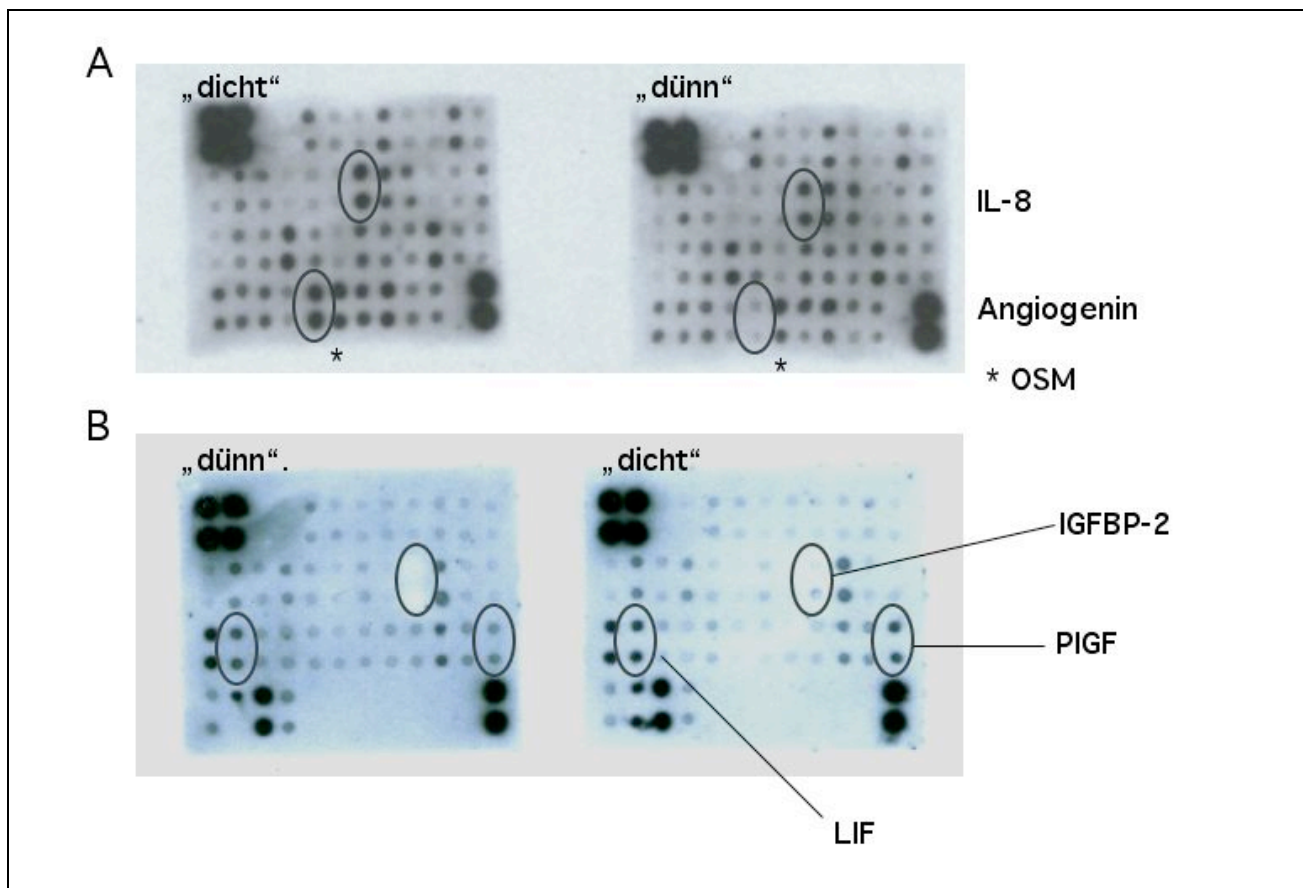


Abb. 3.48 RKO-Zellen sekretieren Zytokine in den Zellkulturüberstand

A: Inkubation der Zytokinmembran Nr.III mit 2ml konditioniertem FKS-freiem Medium dünn ausgesät („dünn“: 1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte) und konfluent („dicht“: 2×10^6 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochplatte) Zellen. Es zeigten sich nach der 2-stündigen Inkubation der Membranen in der „dichten“-Probe stärkere Signale auf den IL-8- und Angiogenin-Antikörperpositionen. Das OSM Signal war nur in einem Punkt der Doppelprobe verstärkt (*). **B:** Die Inkubation der Zytokinmembran Nr. IV mit dem FKS-haltigen Überstand dünn ausgesät („dünn“) und konfluenten Zellen („dicht“) zeigte stärkere Signale für IGFBP-2, PIGF und LIF bei der mit dem konfluenten Medium „dichter“ RKO-Zellen inkubierten Membran.

Im folgenden Experiment wurden sekretierte und möglicherweise sekretierte Faktoren auf ihre Fähigkeit, das Apoptoseverhalten der RKO-Zellen zu beeinflussen, getestet (zusammengefasst in Tab. 3.9). Weder NO (PIGF setzt NO frei; Angelucci et al. 2001), EGF, IGF, IL-6, noch Angiogenin, IL-8 oder OSM beeinflussten das Apoptoseverhalten der RKO-Zellen. In diesem Zusammenhang wurden auch entsprechende Inhibitoren untersucht: L-NAME, ein Inhibitor der NO-Synthase. AG490, ein Inhibitor des JAK/STAT Signalweges, da das sekretierte LIF, ein Mitglied der IL-6-Familie, möglicherweise diesen Signalweg aktiviert (Kritikou et al. 2003, Iwamoto et al. 2004). Rapamycin welches den mTOR-vermittelten Signalweg hemmt (mTOR wird durch PI3K aktiviert; vgl. 3.7.5) und MMPI, ein Inhibitor der Metalloproteinasen-7, -9, -3 und -1, da Metalloproteinasen an der Freisetzung bzw. Abspaltung membrangebundener Zytokine beteiligt sein könnten. Während L-NAME die hCD95L-induzierte Apoptose in dünn ausgesäten RKO-Zellen mit konditioniertem Medium nicht beeinflusste, waren AG490 und Rapamycin in der Lage, den Protektionseffekt des konditionierten

RKO-Mediums wieder aufzuheben. Die Zugabe des MMP-Inhibitors lieferte kein eindeutiges Ergebnis, vermutlich sind MMPs indirekt an der Sekretion des „Survival“-Faktors beteiligt.

	DMEM	DMEM+ Substanz	hCD95L	hCD95L + Substanz	
NO (SNP) 250 μ M	1%	1%	25%	32%	
EGF 20 ng/ml	1%	1%	31%	35%	
IGF (40 ng/ml)	1%	2%	31%	30%	
IL-6 10 ng/ml	1%	1%	25%	23%	
Ang 500 ng/ml	1%	1%	25%	23%	
IL-8 20 ng/ml	2%	3%	18%	14%	
OSM 100 ng/ml	2%	2%	17%	13%	
Ang + IL-8	1%	1%	31%	33%	
Ang + IL-8 + OSM	2%	2%	19%	18%	
	Mk	Mk Inhibitor	Mk hCD95L	Mk Inhibitor hCD95L	hCD95L
L-NAME 1mM	5%	2%	10%	7%	18%
AG 490 50 μ M	3%	2%	2%	18%	24%
Rapamycin 50 nM	1%	1%	4%	19%	23%
MMPI 1 μ g/ml (n=3)	2 \pm 0,6%	2%	9 \pm 5,5%	13 \pm 10,4%	27 \pm 8,5%

Tab. 3.7: Unterschiedliche Behandlungen des konditionierten RKO-Mediums zur Untersuchung seiner protektiven Eigenschaft

RKO-Zellen wurden mit von dicht gewachsenen Zellen sekretierten und möglicherweise sekretierten rekombinanten Faktoren inkubiert und daraufhin Apoptose (mit 20 ng/ml hCD95L plus anti-Flag-AK, CHX) ausgelöst. Keine der getesteten Substanzen zeigte einen apoptoseinhibierenden Effekt. Zusätzlich wurde das konditionierte Medium dichter RKO-Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt und das Apoptoseverhalten der damit inkubierten dünn ausgesäten RKO-Zellen untersucht. AG490 und Rapamycin (auf dicht gewachsenen Zellen) waren in der Lage, die mit dem konditionierten Medium dieser Zellen behandelten RKO-Zellen zur Apoptose zu sensitivieren. Die Zugabe von MMPI zu dicht wachsenden Zellen und die anschließende Untersuchung des Überstands auf dünn ausgesäten Zellen hob den protektiven Effekt teilweise wieder auf, jedoch war die Varianz der Ergebnisse (3 Experimente) sehr hoch. Hier gezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen im subG1-Bereich des analysierten Zellzyklusprofils der PI-gefärbten RKO-Zellen. n= Anzahl der Experimente.

Wie bereits in Abb. 3.37 zu sehen ist, lösten sich mit konditioniertem Überstand (Mk) behandelte RKO-Zellen vom Boden der Zellkulturschale ab. Im Folgenden wurde untersucht, ob der Verlust der Adhärenz das Apoptoseverhalten der Zellen beeinflusst (Abb. 3.49). Hierzu wurde versucht, „dünn“ und „dicht“ ausplattierte Zellen mit einer Poly-Hema Beschichtung der Kulturschalen, welches eine Anheftung verhindern sollte und einer Inkubation unter ständiger Schüttelbewegung in Einzelzellsuspension zu halten. Die Zusammenfassung aller Experimente zeigte im Mittel eine Aufhebung des Protektionseffekts dicht ausgesäter Suspensionszellpopulationen. Allerdings war die Varianz der einzelnen Experimente sehr hoch, was auch anhand der Fehlerbalken zu erkennen ist, so dass keine endgültige Aussage bezüglich der Beteiligung des Adhärenzverlustes am Protektionseffekt gemacht werden kann. Auffallend war auch, dass die Zellen trotz Suspension in Gruppen zusammen

hafteten (Daten nicht gezeigt). Im Zusammenhang mit den vorherigen Experimenten kann spekuliert werden, dass die RKO-Zellen nur bei Anhaftung ein anti-apoptotisch wirkendes Zytokin sekretieren.

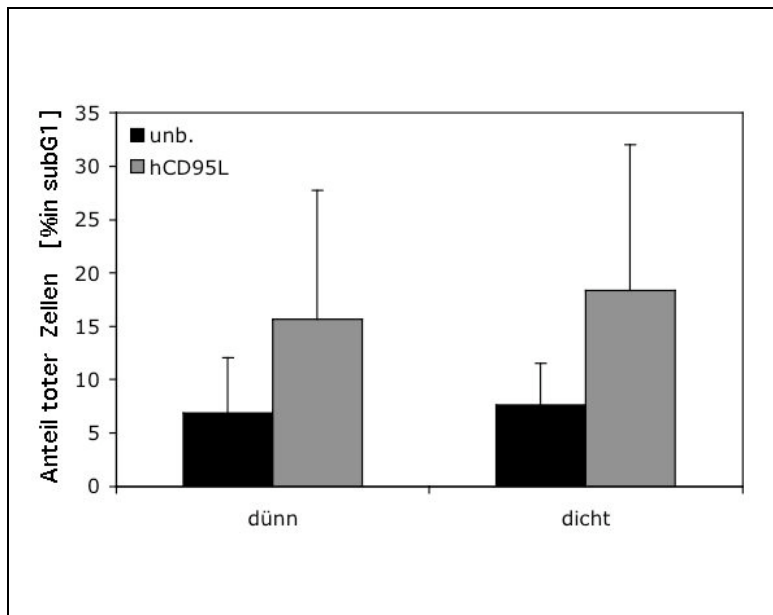


Abb. 3.49

Apoptoseverhalten der RKO Suspensionskulturen

Dünn ausgesäte („dünn“) und dicht ausgesäte („dicht“) Zellen wurden durch Beschichtung der Kulturschalen mit PolyHema und unter permanenter Schüttelbewegung in Suspension gehalten. Durch die Zugabe von 20 ng/ml hCD95L, 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper und 100 ng/ml CHX wurde Apoptose ausgelöst. „Dünne“ wie „dichte“ Zellsuspensionen reagierten daraufhin gleichermaßen: 15,6±12,1% der dünn ausgesäten Zellsuspension war im subG1-Bereich nachweisbar sowie 18,4±13,6% des dicht ausgesäten Zellansatzes. Nach Ernten und Permeabilisierung der Zellen wurde die DNA mit PI angefärbt, um die Zellzyklusverteilung im Durchflußzytometer zu analysieren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 7 unabhängigen Versuchen.

Um auszuschließen, dass wegen eines Abbaus des hCD95L-Moleküls im Überstand konfluenter RKO-Zellen protektive Effekte gemessen werden, wurde eine hCD95L-Stammlösung in konditioniertem Medium dichter Zellen angesetzt und diese 1:100 auf die Gebrauchskonzentration verdünnt und eingesetzt. Sollten z.B. Proteasen im Überstand dichter RKO-Zellkulturen die hCD95L-Moleküle hydrolysieren, dann sollte der hCD95-Ligand in der hierbei verwendeten Stammlösung inaktiviert werden. Die anschließende Verdünnung schließt bei diesem Experiment einen direkten Einfluss des Überstands konfluenter Kulturen auf die dünn ausgesäten Zielzellen aus. Es starben 28% der mit diesem hCD95-Liganden behandelten RKO-Zellen (Abb. 3.50), was bestätigte, dass der Kulturüberstand hCD95L nicht in seiner Funktionalität einschränkte. Dies stand auch in Einklang damit, dass hCD95L in der Lage war, eine DISC-Bildung in dichten Zellen auszulösen (Abb. 3. 41).

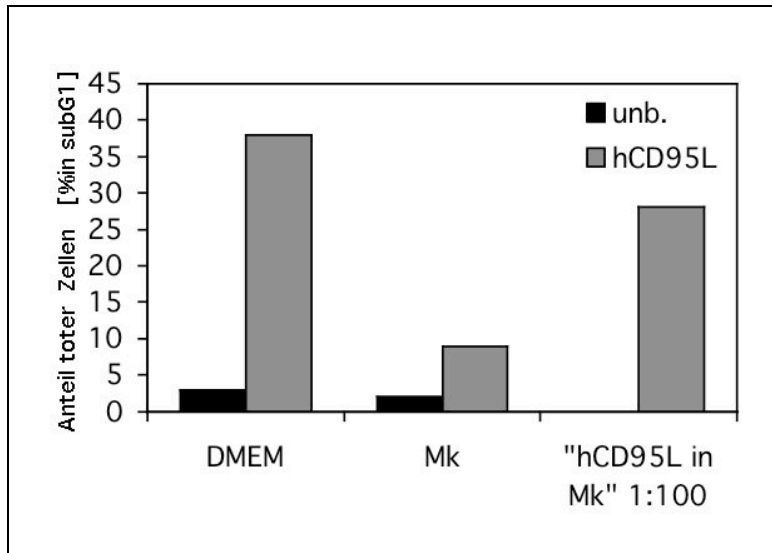


Abb. 3.50

hCD95L bleibt im Überstand der RKO-Zellen intakt

Eine im Kulturüberstand dichter RKO-Zellen (Mk) angesetzte hCD95L-Stammlösung wurde 1:100 (10 ng/ml) im Versuch eingesetzt („hCD95L in Mk“). Dies hatte die Apoptose von 28% dünn ausplattierter Zellen zur Folge. Das für die Verdünnung benutzte konditionierte Medium (Mk) zeigte protective Eigenschaften, denn eine Kultivierung dünner Zellen mit anschließender hCD95L-Behandlung in Mk führte nur bei 9% der Zellen zur Apoptose. Kontrollzellen ohne Inkubation mit konditioniertem Medium (DMEM) starben zu 38% nach einem Stimulus mit 10 ng/ml hCD95L, 1 µg/ml anti-Flag-Antikörper und 100 ng/ml CHX.

Bei weiteren Versuchen mit dem protektiven Zellkulturüberstand dichter RKO-Zellen stellte sich heraus, dass der anti-apoptotische Effekt titrierbar war: Wurde das verbrauchte bzw. konditionierte Medium mit frischem Medium, das nicht von RKO-Zellen stammte, verdünnt, verschwand der Protektionseffekt (Abb. 3.51 A). Bei einer 1:5-Verdünnung waren 18% einer dünn ausgesäten und mit hCD95L behandelten Zellpopulation im subG1-Bereich nachweisbar. Bei einer 1:10-Verdünnung waren dies 23% und bei einer 1:50-Verdünnung war der protektive Effekt vollkommen aufgehoben: 36% der Zellen befanden sich nach der hCD95L-Behandlung im subG1-Bereich, im Vergleich zu 37% einer unbehandelten, subkonfluenten Kontrollpopulation nach Inkubation mit hCD95L.

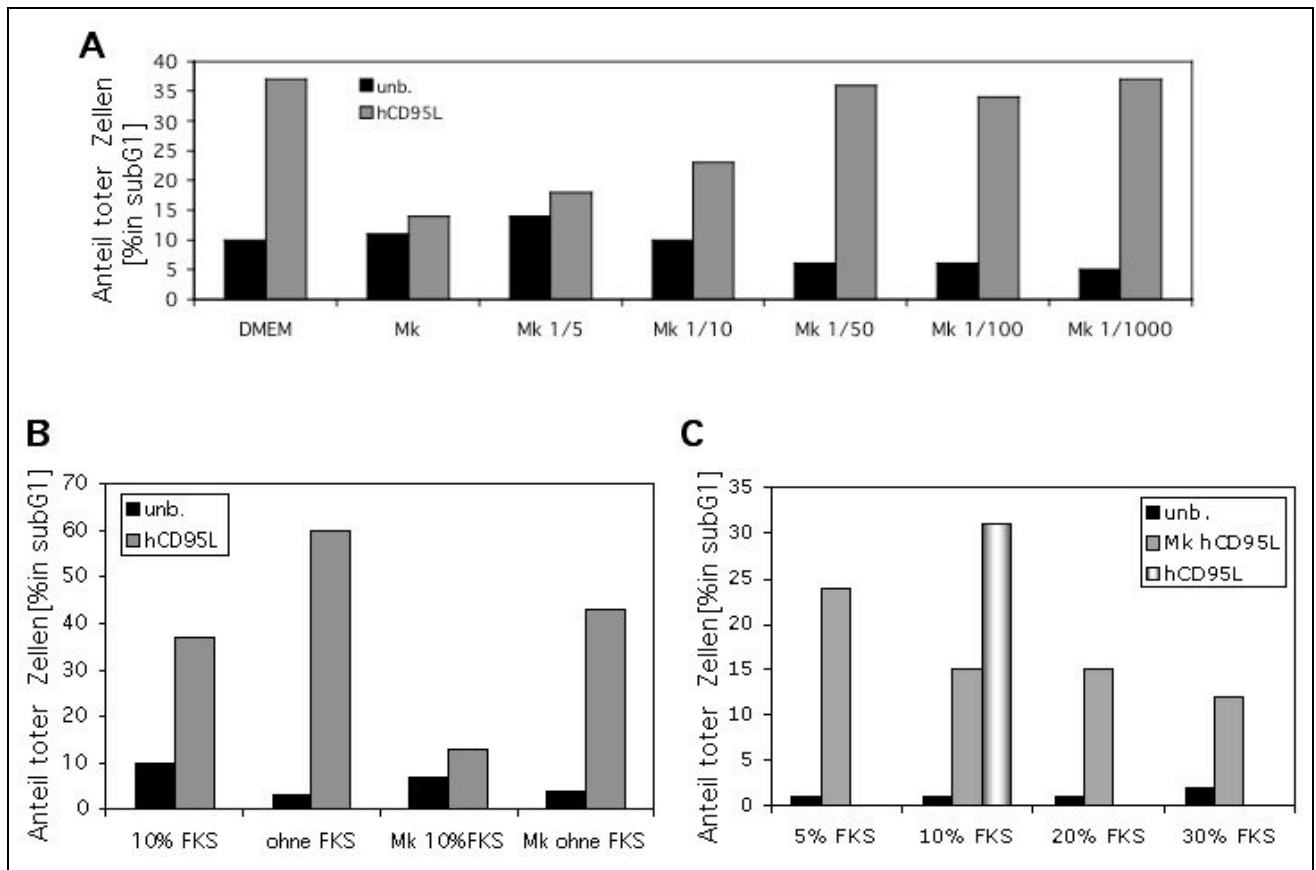


Abb. 3.51 Der apoptosehemmende Faktor in konditioniertem RKO-Medium wirkt konzentrationsabhängig und wird auch in serumfreies Medium sekretiert

A: Verdünnung des verbrauchten bzw. konditionierten Mediums dicht ausgesäter Zellen (Mk) mit frischem Zellkulturmedium in den Verhältnissen 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, und 1:1000. Ab einer 1:50-Verdünnung war der protektive Effekt bereits aufgehoben, wenn die Mischung auf proliferierende Zellen („dünn“) gegeben wurde, die anschließend mit hCD95L inkubierten. **B:** Die apoptosehemmende Eigenschaft zeigte sich auch in serumfreiem Medium „dichter“ Zellen. In ebenfalls serumfreiem Medium kultivierte „dünne“ Kontrollzellen starben nach hCD95L-Behandlung zu 60%, während mit „Mk ohne FKS“ kultivierte dünne Zellen nur zu 43% im subG1-Bereich detektierbar waren. **C:** FKS-Konzentrationsreihe: Dichte Zellen wurden mit 5%, 10%, 20% und 30% FKS-haltigem Medium kultiviert, und das konditionierte Medium wurde anschließend auf seine apoptosehemmende Wirkung hin getestet. Dünn ausgesäte Kontrollzellen (10% FKS) starben nach hCD95L-Inkubation zu 31%. Unter den „Mk-5% behandelten“ dünnen Zellen waren 24% der Zellen apoptotisch. Eine Inkubation dünn ausgesäter Zellen mit „Mk-10%“ und „Mk-20%“ reduzierte den Anteil apoptotischer Zellen auf 15%. Die Inkubation mit „Mk-30%“ protektionierte am deutlichsten: nur 12% der Zellen waren im subG1-Bereich nachweisbar.

Im Folgenden wurde getestet, ob das Fehlen von Nährstoffen bzw. Energie (ATP-Mangel) oder eine de novo Proteinsynthese für den protektiven Effekt des konditionierten Mediums nötig waren. Tabelle 3.8 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse. Wurden RKO-Zellen in serumfreiem Medium kultiviert (-FKS), waren sie trotzdem in der Lage, protektives konditioniertes Medium zu produzieren (Tab. 3.8: 43% zu 60% apoptotische Zellen; Abb. 3.51 B). Die Zugabe von zusätzlichen 10% FKS zum konditionierten Zellkulturmedium der Zellen hatte keinen Einfluss auf dessen apoptosehemmende Wirkung (Tab. 3.8: 4 % zu 30% apoptotische Zellen). Im Gegenteil je höher der FKS-Gehalt des verbrauchten Mediums, desto stärker die Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose (Abb. 3.51 C).

	DMEM	Mk	DMEM +hCD95L	Mk + hCD95L
- FKS	3%	4%	60%	43%
+ 10%FKS	2%	3%	30%	4%
+ Glucose	5%	12%	33%	14%
+ Glutamin	5%	8%	33%	6%
+ Hepes (pH)	2%	3%	44%	11%
80°C	5%	7%	33%	6%
+ CHX	5%	4%	35%	12%

Tab. 3.8: Unterschiedliche Behandlungen des verbrauchten konditionierten Mediums zur Untersuchung seiner protektiven Eigenschaft

Das verbrauchte Medium dichter RKO-Zellen wurde auf die hier aufgelistete Art und Weise behandelt und das Apoptoseverhalten der damit inkubierten dünn ausgesäten RKO-Zellen nach CD95-Apoptoseauslösung quantifiziert. Keine der Behandlungen war in der Lage, die protektiven Eigenschaften aufzuheben.

Auch die Zugabe von Glucose (5 mg/ml) oder Glutamin (10%) konnte die mit verbrauchtem Medium behandelten Zellen nicht zur hCD95L-induzierten Apoptose sensitivieren. Unter Verwendung von Hepes-Puffer wurde versucht, einer Übersäuerung des konditionierten Mediums durch die produzierende dichte RKO-Kultur entgegenzuwirken. Dennoch war das verbrauchte und mit Hepes-behandelte Medium in der Lage, die CD95-vermittelte Apoptose zu hemmen (11% zu 44%, Tab. 3.8). Durch eine einstündige Inkubation des verbrauchten Mediums bei 80°C wurde versucht, die möglicherweise von den dicht ausgesäten Zellen sekretierten Proteine durch Hitzedenaturierung zu inaktivieren. Diese Behandlung führte jedoch nicht zur Aufhebung der Protektion (6% im Vergleich zu 33% tote Zellen, Tab. 3.8). Die Behandlung der Zellen, die zur Herstellung des konditionierten Mediums benutzt wurden, mit 100 ng/ml Cycloheximid zur Hemmung der Proteinneusynthese führte trotzdem zur Produktion eines protektiven Zellkulturüberstandes (12% zu 35%, Tab. 3.8). Dabei bleibt zu beachten, dass die CHX-Konzentration nicht weiter austitriert wurde und der Einfluss auf die Proteinbiosynthese nicht weiter untersucht bzw. nachgewiesen wurde.

Im folgenden Experiment wurde der konditionierte RKO-Zellkulturüberstand (FKS frei) mit Trypsin verdaut, um damit ein möglicherweise sekretiertes anti-apoptotisches Protein zu inaktivieren. Hierzu wurde das konditionierte Medium 10 Minuten mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurde zur Kontrolle hCD95L mit Trypsin verdaut. Die Hydrolyse wurde anschließend durch Zugabe von 10% FKS gestoppt. Abbildung 3.52 zeigt, dass diese Trypsin-Behandlung tatsächlich dazu führte, dass der hCD95-Ligand nicht mehr in der Lage war, in dünn ausgesäten RKO-Zellkulturen Apoptose auszulösen (hCD95L TRY). Allerdings zeigte das mit Trypsin behandelte konditionierte Medium immer noch anti-apoptotische Eigenschaften, denn es reduzierte den Anteil apoptotischer Zellen nach hCD95L-Behandlung von ca. 20% auf 10% (Mk TRY + hCD95L). Mit Trypsin verdautes, nicht konditioniertes Kontrollmedium beeinflusste das Apoptoseverhalten nicht; nach hCD95L Behandlung

starben 18% der dünn ausgesäten Zellkultur (DMEM TRY + hCD95L). Parallel zur Trypsin-Behandlung wurde hCD95L mit PBS inkubiert, um sicherzugehen, dass das Trypsin das Molekül hydrolysierte und inaktivierte und dass nicht die Inkubation für 10 Minuten bei 37°C zum Funktionsverlust führte. Dies war nicht der Fall, denn 20% der „dünnen“ Zielzellen starben durch die Behandlung mit „hCD95L PBS“.

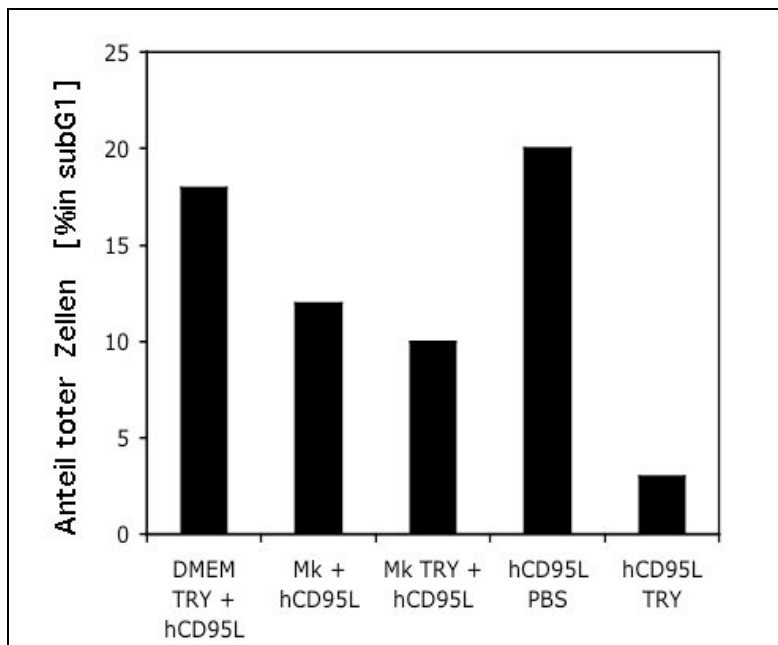


Abb. 3.52

Trypsinverdau des konditionierten Mediums hebt die Protektion nicht auf

Trypsinverdau von konditioniertem und nicht konditioniertem Medium. Die Zugabe von hCD95L zur Apoptoseinduktion führte zum Zelltod von 18% der Kontrollzellen ohne RKO-Zellüberstand (DMEM TRY + hCD95L), während lediglich 10% der „Mk TRY + hCD95L“-Probe starben. Die Behandlung von hCD95L mit Trypsin zeigte, dass das Enzym unter den gewählten Bedingungen in der Lage war, Proteine zu verdauen. Das hCD95L-Molekül war nach dieser Inkubation nicht mehr funktionsfähig (hCD95L TRY, 4% subG1). Eine entsprechende Inkubation mit PBS statt Trypsin beeinflusste die Apoptoseinduktion nicht (hCD95L PBS, 20% subG1).

3.7.2 Apoptoseverhalten anderer Zelllinien nach Inkubation in konditioniertem RKO-Medium

Um zu untersuchen, ob es sich bei der protektiven Eigenschaft des von „dichten“ Zellen konditionierten Mediums um einen auf die RKO-Zellen beschränkten Effekt handelt, wurden auch HeLa- (Zervixkarzinom), NIH 3T3- (Mausfibroblasten) und CHO- (Chinese Hamster Ovarian) Zellen mit konditioniertem Medium (Mk) der jeweiligen Zelllinie behandelt und mit hCD95L zur Apoptose stimuliert (Abb. 3.53). Während HeLa-Zellen ebenfalls geschützt wurden (Abb. 3.53 A), verhielten sich CHO- (Abb. 3.53 B) und NIH 3T3-Zellen (Abb. 3.53 C) anders. Eine Dichtearretierung oder Behandlung mit konditioniertem Medium sensitivierte diese nicht humanen Zelllinien, die nicht von Tumoren abstammen, sogar zur CD95-vermittelten Apoptose.

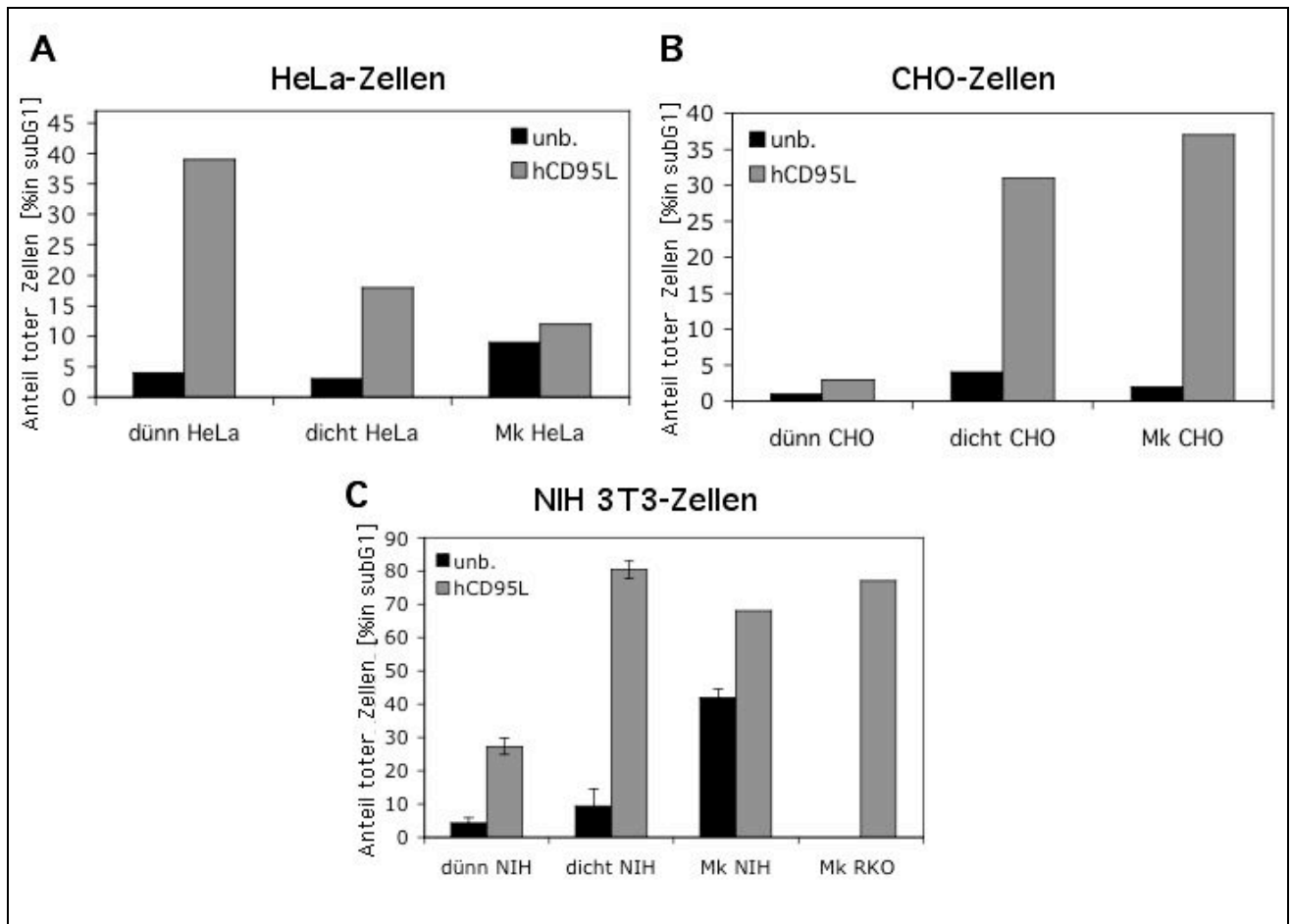


Abb. 3.53 Unterschiedliches Apoptoseverhalten der Zelllinien HeLa, CHO und NIH 3T3 nach Inkubation mit konditioniertem Medium

A: 39% der HeLa-Zellen reagierten auf die Inkubation mit 50 ng/ml hCD95L (mit 100 ng/ml CHX, 1 µg/ml anti-Flag-AK) mit Zelltod. Dicht ausgesäte oder mit dem verbrauchten Medium dichter HeLa-Zellen behandelte HeLa-Zellen starben nur zu 18 % (dicht), bzw. 12% (Mk). **B:** CHO-Zellen reagierten nur in den Zuständen „dicht“ (31%) und „Mk“ (37%) auf die hCD95L-Behandlung. **C:** Dünn ausgesäte NIH 3T3-Zellen starben durch die Inkubation mit 20 ng/ml hCD95L (plus CHX und anti-Flag-AK) zu 27%. Wurden diese Zellen dicht ausgesät und mit hCD95L inkubiert, waren 80% der Zellen apoptotisch. Eine Behandlung mit dem konditionierten Medium dichter NIH 3T3- oder RKO-Zellen resultierte in einem Zelltod von 68% bzw. 77% der Zellen nach hCD95L-Behandlung. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

3.7.3 Untersuchung der Vitalität und Proliferationsfähigkeit abgelöster Zellen

Konfluente sowie mit konditioniertem Medium behandelte RKO-Zellen (Abb. 3.37) bzw. HeLa-Zellen lösten sich zum Teil vom Boden des Zellkulturgefäßes ab. Dieser Effekt war zwar auch bei CHO- und NIH 3T3-Zellen zu beobachten, doch zeigten diese abgelösten Zellen die morphologischen Charakteristika apoptotischer Zellen (u.a. Schrumpfung). Daher wurde die Vitalität abgelöster dicht ausgesäter sowie Mk-behandelter RKO-, HeLa-, CHO- und NIH 3T3-Zellen untersucht (Abb. 3.54). Es zeigte sich, dass die RKO-Zellen sofort wieder anwuchsen und stark proliferierten, wenn sie nach Abtrennung separat kultiviert wurden (Abb. 3.54 A). Abgelöste HeLa-Zellen wuchsen ebenfalls an und proliferierten etwas langsamer als die RKO-Zellen (Abb. 3.54 B). CHO-Zellen wuchsen dagegen nicht

an, sondern schwammen als kleine abgerundete tote Zellen in der Vertiefung einer 24-Lochplatte (Abb. 3.54 C). Ein kleiner Anteil der zuvor abgelösten NIH 3T3-Zellen wuchs zwar wieder an, proliferierte aber nicht (Abb. 3.54 D).

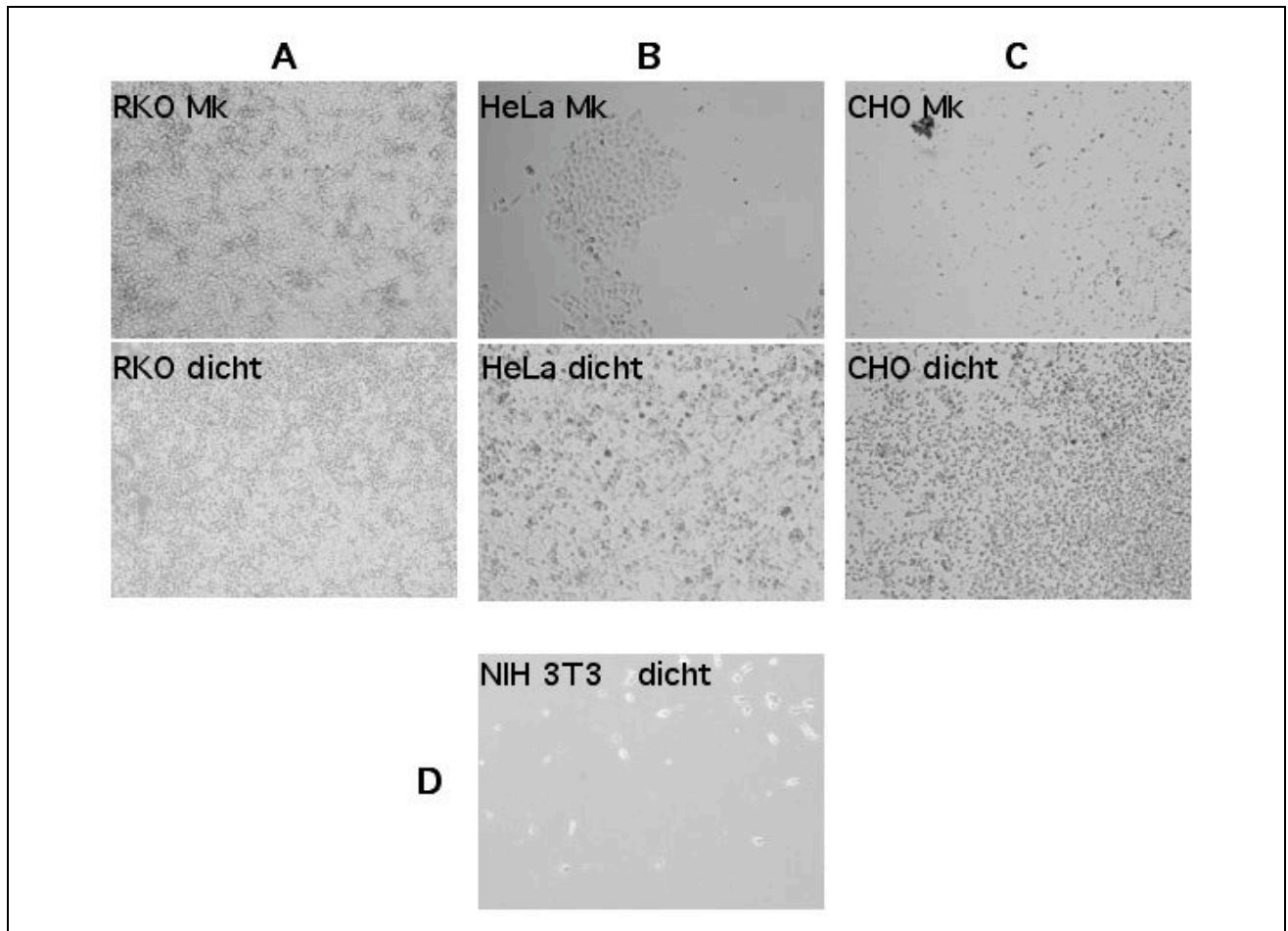


Abb. 3.54 Nach Behandlung mit konditioniertem Medium abgelöste RKO- und HeLa-, aber nicht CHO- und NIH 3T3-Zellen, leben und proliferieren

Die in einer konfluenten („dicht“) sowie in einer mit konditioniertem Medium („Mk“) behandelten Zellpopulation abgelösten RKO-, HeLa-, CHO- und NIH 3T3-Zellen einer 6-Lochplatte wurden durch Zentrifugation von ihrem Medium getrennt und in frischem Medium erneut ausplattiert. **A:** Nach 5-tägiger Kultivierung waren die zuvor abgelösten RKO-Zellen wieder konfluent gewachsen und arretiert. **B:** Abgelöste HeLa-Zellen adherierten ebenfalls und proliferierten erneut. **C:** CHO-Zellen blieben klein und abgelöst. **D:** Nur ein sehr geringer Teil der abgelösten NIH 3T3-Zellen einer dichten Zellkultur adherierte am Plattenboden, proliferierte jedoch nicht.

3.7.4 Protektion durch konditioniertes RKO-Medium gegenüber anderen Apoptosestimuli

Um zu klären, ob auch andere apoptotische Stimuli außer einer hCD95L-Behandlung durch das konditionierte RKO-Medium inhibiert werden, wurden weitere Apoptosestimuli getestet (Abb. 3.55). Dabei wurden die Zellen mit UV (50 mJ/cm²), TRAIL (20 ng/ml, mit CHX), Staurosporin (500 ng/ml; 250 ng/ml; 167 ng/ml) und anti-CD95-AK (1 µg/ml, mit 10 ng/ml Protein A) behandelt.

Die Inkubation mit konditioniertem Medium hemmte auch die durch UV, TRAIL und Staurosporin verursachte Apoptose, interessanterweise jedoch nicht den durch anti-CD95-AK ausgelösten Zelltod.

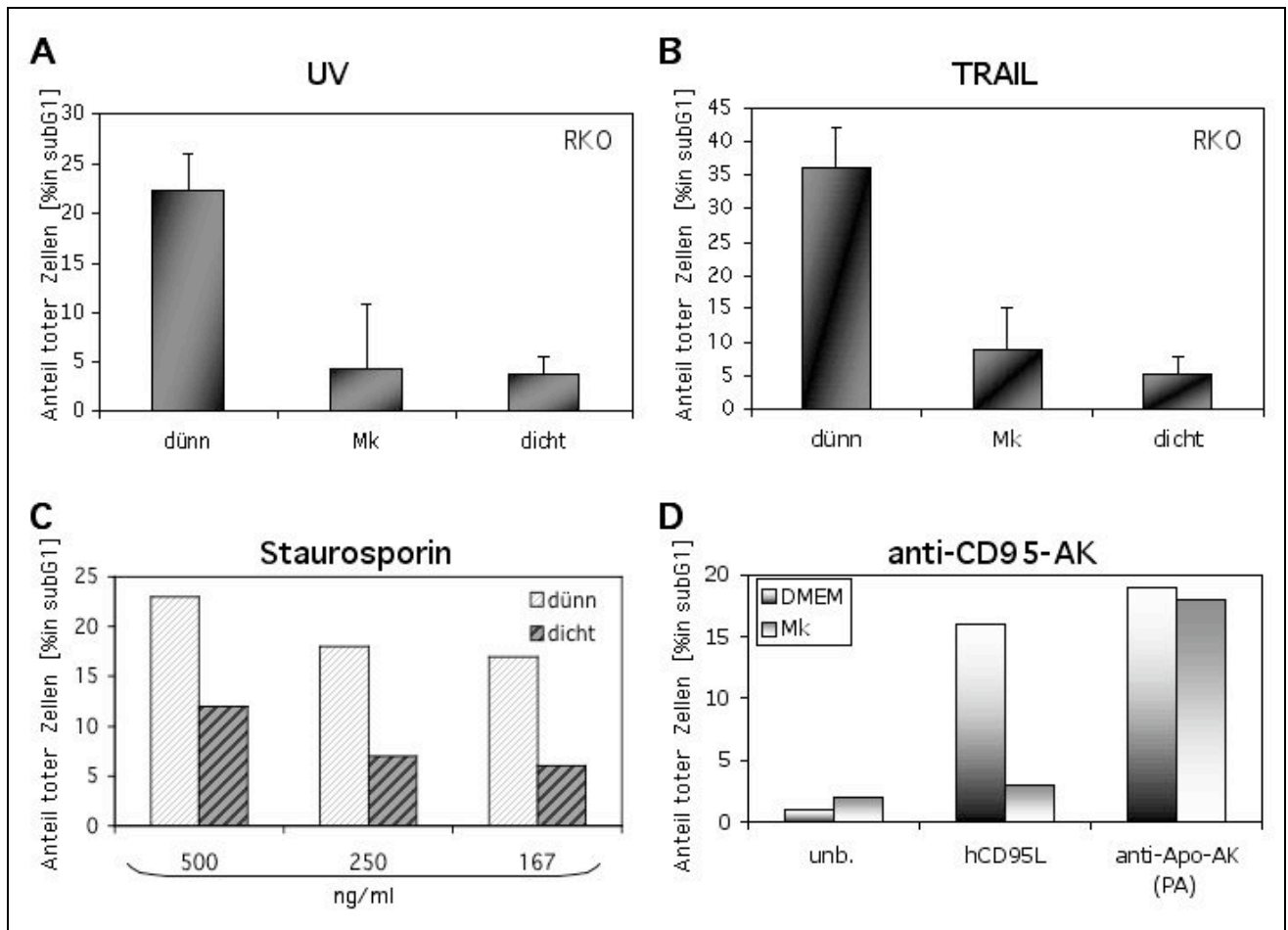


Abb. 3.55 Hemmung der UV-, TRAIL-, Staurosporin-, aber nicht anti-CD95-AK-induzierten Apoptose durch konditioniertes RKO-Medium

A: Unbehandelte „dünne“, und mit konditioniertem Medium („Mk“) behandelte sowie „dichte“ RKO-Zellen wurden am Abend mit 50 mJ/cm^2 UV bestrahlt und nach 16h zur Apoptoseuntersuchung geerntet. Während 22% der „dünnen“ Zellen im subG1-Bereich nachweisbar waren, befanden sich nur jeweils 4% der dünn ausgesäten, Mk-behandelten und der „dichten“ Zellen im subG1-Bereich. **B:** 36% der „dünnen“ Zellpopulation reagierte auf die TRAIL-Inkubation (20 ng/ml TRAIL plus 100 ng/ml CHX) mit Zelltod. Lediglich 9% der Mk-behandelten und 5% der „dichten“ Zellen waren apoptotisch. **C:** Dicht ausgesäte RKO-Zellen zeigten sich einer Staurosporinbehandlung gegenüber weniger sensitiv. Bei einer 1:1000 Verdünnung der $500 \mu\text{g/ml}$ -konzentrierten Stammlösung starben 23% der „dünnen“, aber nur 12% der „dichten“ Zellen. Mit 250 ng/ml Staurosporin waren dies 18% bzw. 7% und mit 167 ng/ml 17% bzw. 6%. **D:** Mit konditioniertem Medium (Mk) inkubierte Zellen ließen sich durch eine Behandlung mit $1 \mu\text{g/ml}$ anti-CD95-AK und 10 ng/ml Protein A (PA) im gleichen Ausmaß wie dünn ausgesäte, unbehandelte (unb.) Zellen töten (18% der Zellen im subG1 Bereich des Zellzyklusprofils nachweisbar).

3.7.5 Analyse apoptoserelevanter Signalübertragungswege nach Behandlung mit konditioniertem Medium

„Dicht“ ausgesätierte sowie mit konditioniertem Medium konfluente Zellen (Mk) behandelte RKO-Zellen reagieren nicht auf Apoptose auslösende Stimuli. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welche Signalwege an der Produktion des protektiven Zellkulturüberstandes beteiligt sind. Der PI3K/Akt-Signalweg ist ein in vielen Prozessen involvierter anti-apoptotisch wirkender Signalübertragungsweg (Vivanco & Sawyers 2002). Daher wurde ein PI3K-Inhibitor (Ly294002, 17 μ M) zu dicht ausgesäten, konfluent werdenden Zellen gegeben. Das verbrauchte bzw. konditionierte Medium der mit Ly294002 behandelten Zellen wurde dann auf seine anti-apoptotische Aktivität getestet (Abb. 3.56 A). Im Gegensatz zu RKO-Zellen, die mit konditioniertem Medium ohne Ly294002-Behandlung (Mk) inkubiert wurden, starben die Zellen, die den konditionierten Überstand von mit Ly-behandelten dicht ausgesätierten Zellen („Mk-Ly“) erhielten, nach 5-stündiger Inkubation mit 20 ng/ml hCD95L (plus CHX und anti-Flag-Antikörper) im vergleichbaren Ausmaß wie die in normalen Medium kultivierten Kontrollzellen.

Obwohl die Zugabe des PI3K-Inhibitors zu dem bereits konditioniertem Medium erst auf den dünn ausgesäten Zellen nur einen schwachen Effekt, d.h. kaum eine Beeinflussung der Protektion unter Berücksichtigung der leicht pro-apoptotischen Wirkung des Inhibitors (Mk+Ly: ca. 14% in subG1; Mk+Ly plus hCD95L: ca. 16% in subG1), zeigte (Abb. 3.56 B: Mk + Ly), ergab eine Überprüfung des Phosphorylierungsstatus der Akt, dass mit konditioniertem Medium (Mk) behandelte, dünn ausgesäte Zellen die aktive, d.h. am Serin 473 phosphorylierte Form der Akt aufwiesen (Abb. 3.56 C).

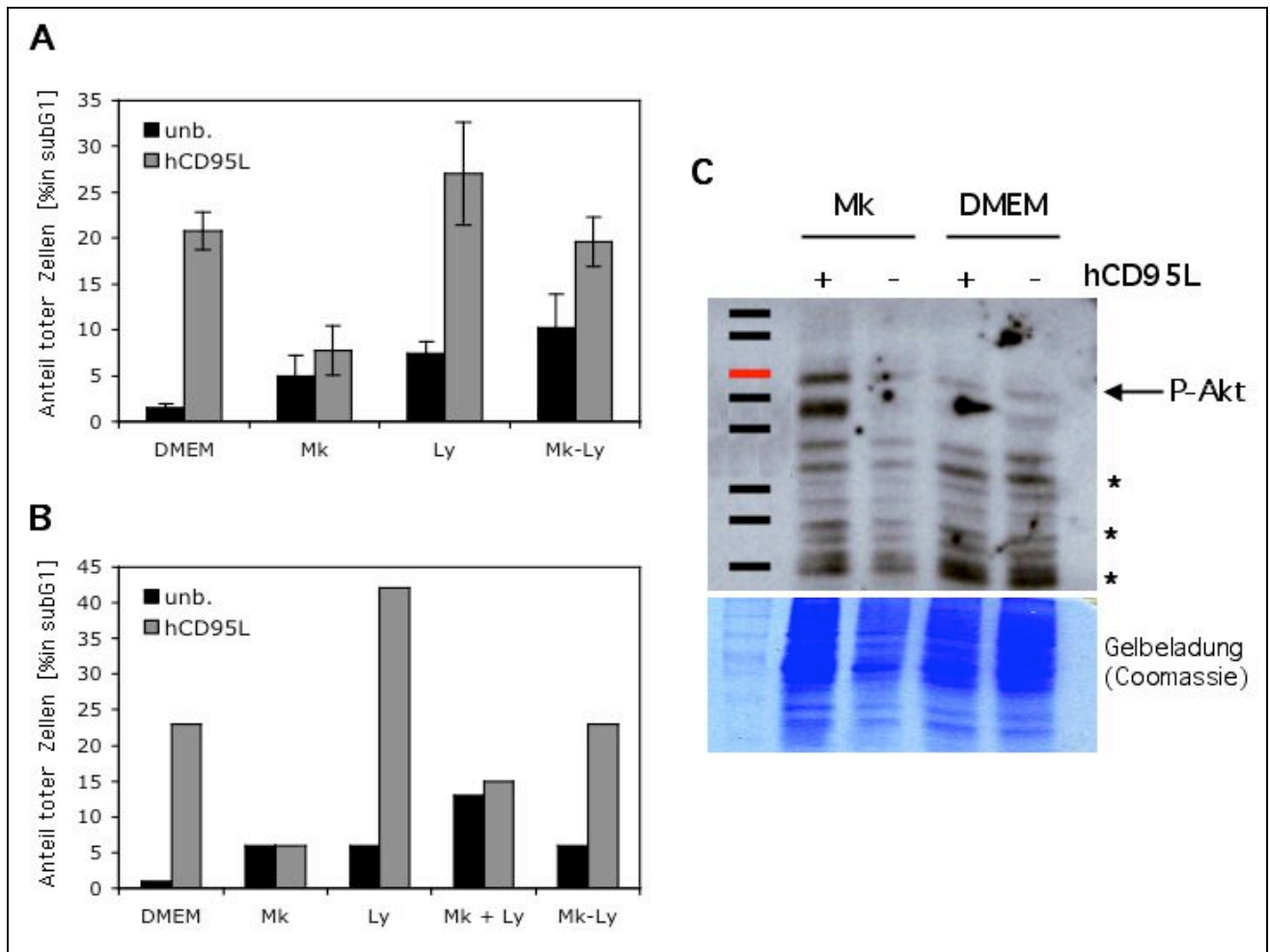


Abb. 3.56 Die Rolle der PI3K für die Produktion protektiven Mediums

A: Die Analyse der Zellzyklusverteilung der PI-gefärbten Proben ergab, dass $21 \pm 2\%$ der dünn ausgesäten, nicht behandelten Kontrollzellen (DMEM) durch hCD95L-Behandlung (20 ng/ml plus $1 \mu\text{g/ml}$ anti-Flag-AK und 100 ng/ml CHX) starben. Nur $8 \pm 3\%$ der mit konditioniertem Medium (Mk) behandelten Zellen wurden durch die Inkubation mit hCD95L apoptotisch. Die Behandlung der RKO-Zellen mit $17 \mu\text{M}$ Ly 294002 hatte einen leicht pro-apoptotischen Effekt (ca. 5% tote Zellen) und es waren nach zusätzlicher Behandlung mit hCD95L $27 \pm 6\%$ der Ly-behandelten Zellen im subG1-Bereich nachweisbar. RKO-Zellen, die im Überstand von Ly-behandelten Zellen inkubiert wurden, zeigten sich hCD95L-sensitiv, denn es befanden sich $20 \pm 3\%$ tote Zellen in der entsprechenden Probe. **B:** Während die Zugabe von 20 ng/ml hCD95L in der Kontrollpopulation zur Apoptose führt, wird die Protektion durch konditioniertes Medium (Mk) durch die Zugabe von Ly kaum aufgehoben (Mk + Ly). Wurde der Inhibitor Ly294002 jedoch zu dicht ausgesäten Zellen zugeführt und deren Überstand auf dünn ausgesäten Zellen getestet, zeigte sich eine Aufhebung des Protektionseffektes (Mk-Ly). **C:** Western Blot-Analyse des Akt-Phosphorylierungsstatus durch Inkubation der Blotmembran mit einem spezifischen anti-phospho-Akt-Antikörper, der die Serin 473 Phosphorylierung erkennt. Mit * sind unspezifische Banden markiert, welche die ungleiche Proteinbeladung (vgl. Coomassie-Färbung) anzeigen, denn die Banden der „Mk ohne hCD95L“-Probe sind wesentlich schwächer. Es war lediglich in der „Mk + hCD95L“-Probe die phosphorylierte Akt-Kinase nachweisbar.

Da schon zuvor die Beteiligung der PKC an anti-apoptotischen Prozessen der RKO-Zellen gezeigt werden konnte (Abb. 3.22), wurde zusätzlich die Beteiligung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen an der Produktion des protektiv wirkenden Überstandes untersucht. Hierzu wurde ein spezifischer Inhibitor (Gö6976) dieser Isoformen zum Medium von dicht ausgesäten RKO-Zellen zugegeben, die anschließend konfluent wachsen gelassen wurden (Abb. 3.57). Mit dem Kulturüberstand dieser Zellen

behandelte dünn ausgesätierte RKO-Zellen reagierten mit Apoptose auf die 5-stündige Inkubation mit hCD95L, CHX und anti-Flag-Antikörper.

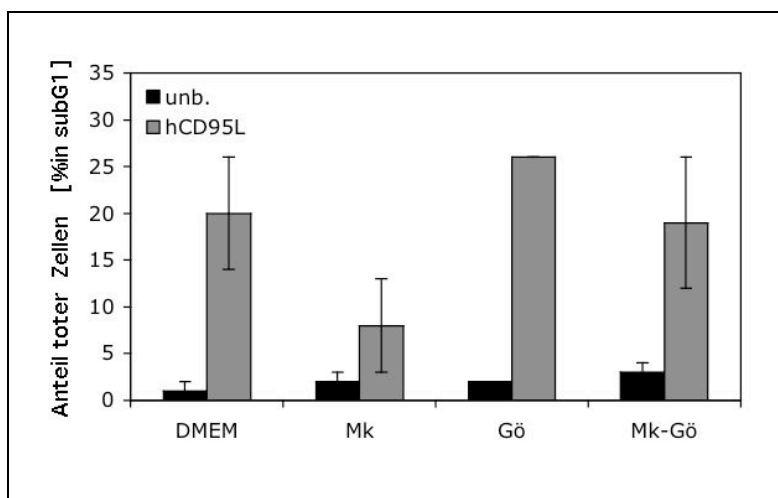


Abb. 3.57

Ca²⁺-abhängige PKC-Isoformen spielen eine Rolle für die anti-apoptotische Wirkung des konditionierten RKO-Mediums

Nach einer hCD95L-Behandlung waren 20±6% unbehandelte Kontrollzellen (DMEM), 8±5% mit normalem konditioniertem Medium (Mk) behandelte, 26% der mit Gö6976 inkubierten und 19±7% der mit dem Überstand der mit Gö inkubierten dicht ausgesäten Zellen (Mk-Gö) behandelten Zellen tot. Die Zugabe von 5 µM Gö zu den dicht ausgesäten Zellen hob den protektiven Effekt des von dichten Zellen konditionierten Mediums wieder auf. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Zugabe von Gö6976 zu dem bereits konditionierten Medium auf dünn ausgesäten Zellen hatte lediglich einen schwachen Effekt, d.h. das konditionierte Medium besaß weiterhin anti-apoptotische Wirkung (Tab. 3.9).

	DMEM	Mk	Mk + Gö
ohne hCD95L	2%	3%	10%
mit hCD95L	44%	7%	16%

Tab. 3.9 Die Zugabe von Gö6976 direkt zu konditioniertem Medium beeinflusst kaum dessen protektiven Effekt

Mit und ohne 20 ng/ml hCD95L (plus anti-Flag-AK, CHX) behandelte RKO-Zellen waren durch eine Behandlung mit konditioniertem Medium auch dann gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose geschützt, wenn der PKC-Inhibitor Gö6976 (5µM) zu dem Überstand auf den zu untersuchenden dünn ausgesäten RKO-Zellen zugegeben wurde.

3.8 Einfluss des konditionierten Mediums auf das Migrations- und Invasionsverhalten von RKO-Zellen

3.8.1 Migrationssverhalten der RKO-Zellen

Aus den Zytokinarray-Experimenten lässt sich ablesen, dass RKO-Zellen IL-8 und Angiogenin nach Zugabe in das überstehende Medium sekretieren. Zwar zeigten beide Faktoren in rekombinanter Form keinen Effekt auf das Apoptoseverhalten der RKO-Zellen (Tab. 3.7), aber da sie bekanntermaßen an Angiogenese- und Migrationsprozessen beteiligt sind (Wilson et al. 1999, Hatzi & Badet 1999), wurde nun das Migrationsverhalten der RKO-Zellen untersucht (Abb. 3.58). Mit konditioniertem Medium

(Mk) behandelte RKO-Zellen migrierten im Gegensatz zu unbehandelten RKO-Zellen in die in diesem Assay benutzten Polycarbonatmembranen.

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens der RKO-Zellen wurde ein Einsatz mit einer Polycarbonatmembran in die Vertiefung einer 6-Lochplatte eingesetzt. Dadurch wurde die Vertiefung in zwei Kammern geteilt, in eine obere und eine untere Kammer, die durch die Membran getrennt werden. Die Zellsuspension der zu untersuchenden Zellen wurde in die obere Kammer gegeben, während in die untere Kammer frisches Medium (DMEM) kam, das unter Umständen zusätzliche mit einem Lockstoff versetzt war. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurden die nicht in die Membran eingewanderten Zellen abgewaschen und die eingewanderten Zellen entweder durch Anfärbung mit einem Farbstoff (Kristallviolett) oder mit einer selbst entwickelten Nachweis-Methode analysiert. Hierzu wurden die RKO-Zellen zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff (CFSE) markiert. Die anschließende Auswertung erfolgte dann im Fluoreszenzmikroskop.

Wurden Angiogenin plus IL-8 und im Vergleich konditioniertes Medium (Mk) als Lockstoff in der unteren Kammer benutzt, migrierten RKO-Zellen ebenfalls aus der oberen Kammer in die Membranen.

Der Migrationsassay wurde auch mit kollagenbeschichteten Membranen durchgeführt, wobei die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigt wurden (Daten nicht gezeigt).

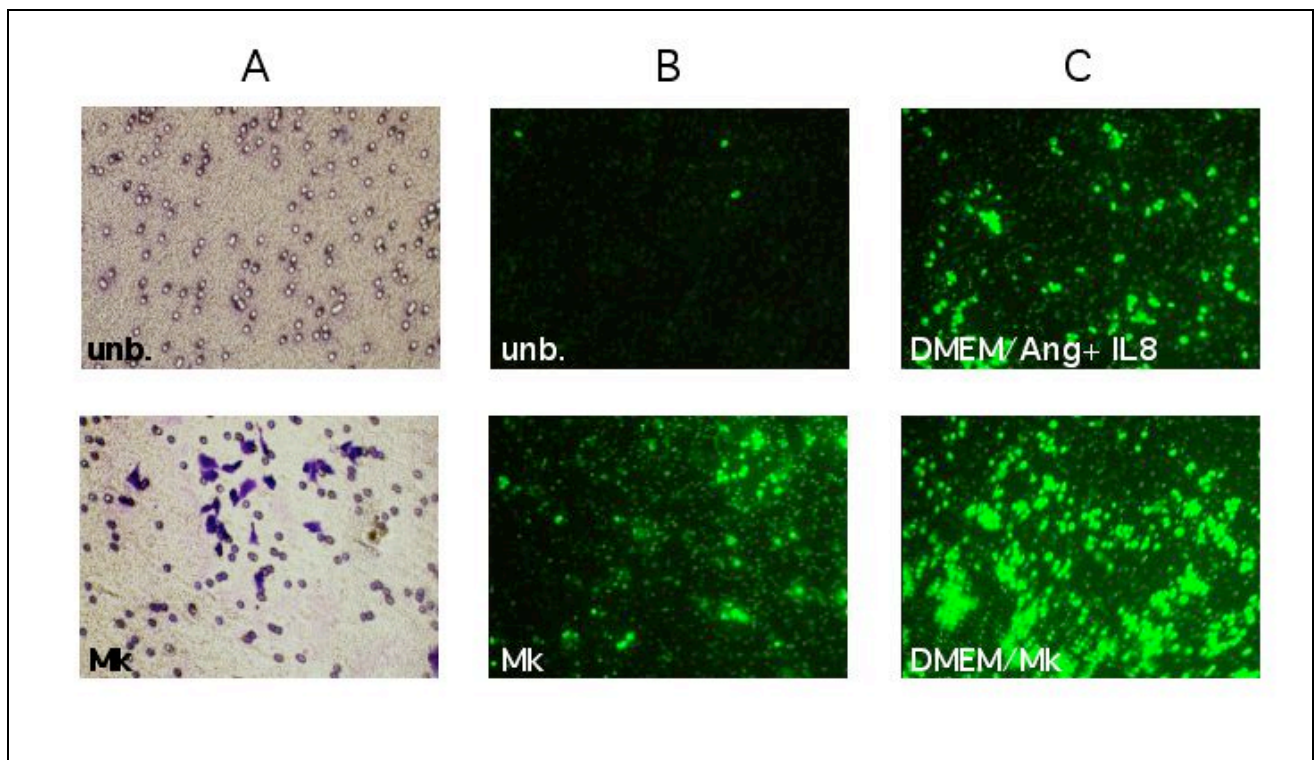


Abb. 3.58 Konditioniertes Medium verstärkt das Migrationspotential von RKO-Zellen

A: Unbehandelte (unb.) und mit konditioniertem Medium behandelte (Mk) Zellen wurden für 4h auf Polycarbonatmembranen in DMEM (unb.) bzw. von dichten Zellen konditioniertem Medium (Mk) kultiviert. Nachdem nicht migrierte Zellen abgewaschen wurden, wurden in die Membran eingewanderte Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Während keine der Kontrollzellen in der Membran detektierbar war, konnten mit konditioniertem Medium behandelte Zellen nachgewiesen werden (violett gefärbt). **B:** In dieser selbst entwickelten Methode wurden jeweils 1×10^5 unbehandelte sowie mit konditioniertem Medium behandelte Zellen (Mk) mit CFSE gefärbt und in DMEM bzw. konditioniertem Medium auf die Membranen ausplattiert. Nach 4h wurden die nicht migrierten Zellen abgewaschen und die Membranen im Fluoreszenzmikroskop auf den Gehalt an fluoreszierende Zellen untersucht. **C:** CFSE gefärbte Kontrollzellen wurden auf die Membranen ausgesät. In der unteren Kammer befanden sich entweder Angiogenin plus IL-8 als Lockstoffe oder konditioniertes Medium (Mk). In beiden Fällen wanderten RKO-Zellen in die Membranen ein (grün fluoreszierend).

3.8.2 Invasivitätsverhalten der RKO-Zellen

Nachdem die RKO-Zellen für sechs Stunden zur Migrationsuntersuchung (s.o.) kultiviert worden waren, konnten einige Zellen nicht nur in der Membran, sondern auch direkt in der unteren Kammer nachgewiesen werden. Diese durch die Membran durchgewanderten CFSE-gefärbten Zellen wurden nach 6-stündiger Inkubation gesammelt und anhand ihrer fluoreszierenden Eigenschaft im Durchflußzytometer vermessen (Abb. 3.59). Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollpopulation (unb.) zeigte sich, dass bei den mit konditioniertem Medium behandelten RKO-Zellen (Mk) 2,4-mal so viele CFSE-positive Zellen in der unteren Kammer gemessen wurden. Wurde dem konditionierten Medium frisches FKS zugesetzt („Mk FKS“), um einem FKS-Konzentrationsgradienten zwischen oberer und unterer Kammer entgegenzuwirken, wanderten sogar 3-mal so viele Zellen in die untere Kammer. Wurden Angiogenin und IL-8 als Lockstoffe in der unteren Kammer eingesetzt, wanderten 1,4-mal so viele Zellen durch die Membran wie bei Kontrollzellen, bei denen sich DMEM in der unteren Kammer befand. Dass Angiogenin und IL-8 tatsächlich einen Einfluss auf die Invasivität der RKO-Zellen haben, wird durch die Beobachtung erhärtet, dass bei Zellen, die mit durch Trypsinverdau inaktiviertes Angiogenin und IL-8 versetzt wurden, sogar weniger Zellen als bei der unbehandelten Kontrolle (unb.) in der unteren Kammer nachgewiesen werden konnten (0,6-fach). Trotzdem können beide Faktoren nicht alleine für die erhöhte Invasivität der mit konditioniertem Medium behandelten RKO-Zellen verantwortlich sein, denn das „komplette“ konditionierte Medium induziert eine deutlich höhere Invasivität als das normale DMEM-Medium, dem rekombinantes Angiogenin und IL-8 zugesetzt worden waren.

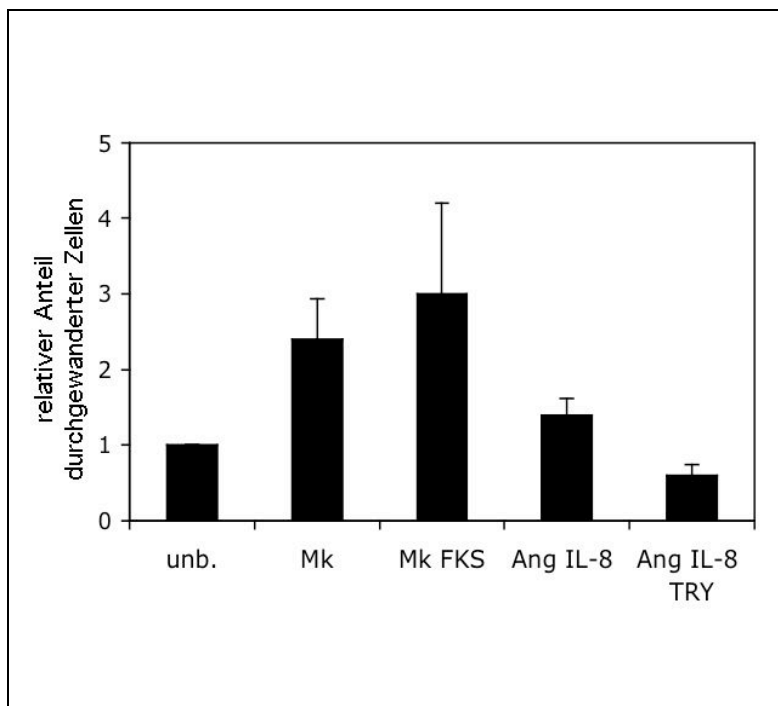


Abb. 3.59

Durchflußzytometrische Bestimmung CFSE-gefärbter invasiver RKO-Zellen

Unbehandelte, d.h. in DMEM kultivierte und zuvor mit CFSE-gefärbte Kontrollzellen waren nach 6h zu einem geringen Anteil in der unteren Kammer nachweisbar (hier willkürlich auf 1 gesetzt). Der Anteil der mit konditioniertem Medium (Mk) oder konditioniertem Medium plus zusätzlichen 10% FKS (Mk FKS) inkubierten durchgewanderten Zellen wurde zur Kontrollprobe in Relation gesetzt. Dabei zeigte sich, dass in diesen Ansätzen 2,4±1,1 bzw. 3,0±2,4-mal so viele Zellen nach Invasion in die untere Kammer nachweisbar waren. Wurden Angiogenin und IL-8 (Ang IL-8) als Positiv-Kontrolle für invasionsinduzierende „Lockstoffe“ eingesetzt, wanderten 1,4±0,4-mal so viele Zellen wie bei unbehandelten Zellen. Wurden Angiogenin und IL-8 zuvor mit Trypsin hydrolysiert (Ang IL-8 TRY), wanderten nur 0,6±0,3-mal so viele Zellen (Negativkontrolle). Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

Daraufhin wurde das Migrationverhalten der dünn ausgesäten RKO-Zellen analysiert, die mit konditioniertem Medium von dicht ausgesäten und mit Ly294002 bzw. Gö6976 behandelten Zellen inkubiert wurden (Mk-Ly und Mk-Gö) (vgl. Abb. 3.56 und Abb. 3.57), um zu untersuchen, ob die beiden Kinasen PI3K und PKC auch an den Migrationsprozessen beteiligt waren, die durch das konditionierte Medium induziert wurden (Abb. 3.60).

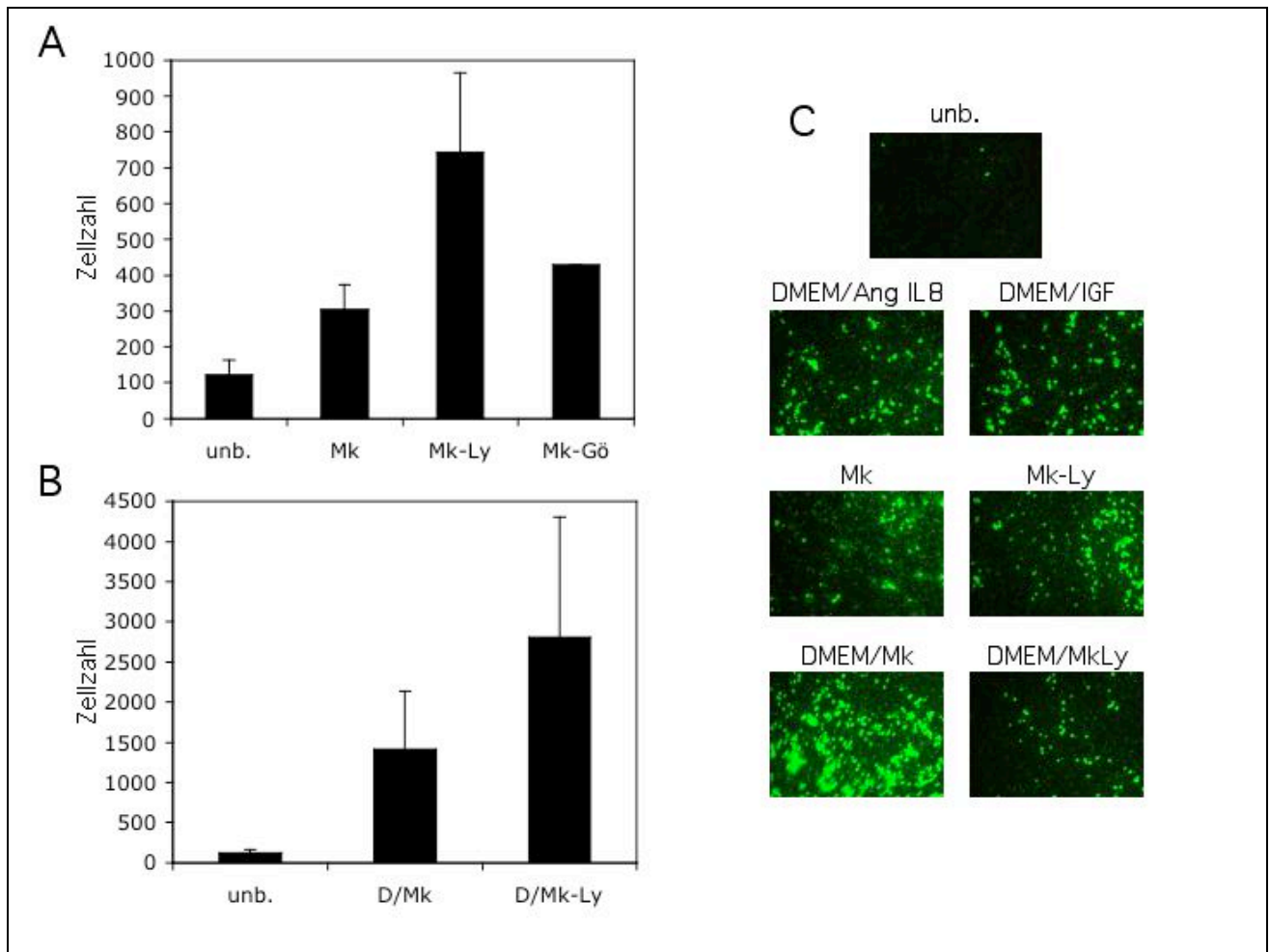


Abb. 3.60 PI3K- und PKC-Aktivität spielen keine Rolle für die durch konditioniertes Medium induzierte Migration der RKO-Zellen

A: Die durch die verwendete Polycarbonatmembran gewanderten CFSE-gefärbten Zellen der unbehandelten Kontrollprobe (unb.) sowie der mit konditioniertem Medium (Mk) alleine oder mit Mk-Ly oder Mk-Gö behandelten Proben wurden im FACS vermessen. Während 123 ± 41 der 10.000 ausgesäten unbehandelten Zellen in der unteren Kammer nachweisbar waren, wurden 304 ± 70 Zellen der Mk-behandelten, 743 ± 222 Zellen der Mk-Ly Probe und 428 Zellen der Mk-Gö Probe detektiert. **B:** Während 1×10^5 unbehandelte RKO-Kontrollzellen in der oberen Kammer in DMEM (D)-Medium ausgesät wurden, befanden sich in der unteren Kammer entweder DMEM-Medium (unb.), Mk (D/Mk) oder Mk-Ly (D/Mk-Ly). Nur 123 ± 41 Kontrollzellen migrierten, im Vergleich zu 1408 ± 730 detektierten Zellen der D/Mk-Probe und sogar 2807 ± 1500 Zellen der D/Mk-Ly-Probe. Gezeigt sind bei A und B die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. **C:** Mikroskopische Aufnahmen der CFSE gefärbten und in die Membran eingewanderten RKO-Zellen. Nur wenige der unbehandelten Zellen wanderten in die Membran ein. Angiogenin und IL-8 sowie IGF waren potente Lockstoffe, die in den RKO-Zellen Migration induzierten. Mit Mk und Mk-Ly kultivierte RKO-Zellen migrierten vergleichbar stark. Wurden Mk oder Mk-Ly in der unteren Kammer vorgelegt, um die RKO-Zellen anzulocken, waren nach 4h Inkubation mehr Zellen der DMEM/Mk Probe in der Membran nachweisbar als bei der DMEM/MkLy Probe.

Zwar führte die Behandlung dicht gewachsener Zellen mit Ly294002 ($17 \mu\text{M}$) oder Gö6976 ($5 \mu\text{M}$) zur Aufhebung des Protektions-, aber nicht des Invasionseffektes (Abb. 3.60 A und B). Eine abgeschwächte Migration wurde beobachtet, wenn das entsprechende Medium (Mk-Ly) in der unteren Kammer eingesetzt wurde (Abb. 3.60 C). Dies kann jedoch eine Folge der schnelleren Invasion der Mk-Ly Zellen sein, d.h. die Zellen sind kaum noch in der Membran, sondern hauptsächlich in der unteren Kammer nachweisbar.

3.9 Unterschiedliche Genexpressionsprofile in arretierten konfluenten und proliferierenden subkonfluenten RKO-Zellen

Eine moderne Methode, das gesamte Expressionsprofil aller exprimierten Gene zwischen zwei Zellpopulationen zu vergleichen, stellt die Hybridisierung der mit Oligonukleotiden beladenen Chips mit markierter cDNA dar, die aus der Gesamt-RNA hergestellt wird. Die automatische Auswertung erfolgt anhand der durch Hybridisierung veränderten Fluoreszenzen. Dabei wurden HG-U133A-Chips der Firma *Affymetrix* verwendet.

Es wurde RNA aus konfluenten arretierten („dicht“: 1×10^7 Zellen pro Petrischale) sowie aus dünn ausgesäten, proliferierenden („dünn“: 1×10^6 Zellen pro Petrischale) RKO-Zellen isoliert, um beide Zustände und ihre unterschiedliche Apoptosesensitivität aus dem Niveau unterschiedlich exprimierter Gene zu analysieren. Insgesamt waren 256 Gene im Vergleich „dünn“ gegen „dicht“ (Ansatz 1) dereguliert und 888 Gene im Vergleich „dünn hCD95L“ gegen „dicht hCD95L“ (Ansatz 3). Dabei war die Mehrheit der Gene in „dünn“ im Vergleich zu „dicht“ herunterreguliert (Tab. 3.10). Apoptose wurde durch die Inkubation mit 50 ng/ml hCD95L plus anti-Flag-Antikörper für 24 Stunden induziert. 119 Gene waren sowohl bei „dünn-dicht“ (1) als auch bei „dünn hCD95L - dicht hCD95L“ (3) dereguliert. 187 Gene waren sowohl in Ansatz (2) (dünn hCD95L – dünn) als auch in Ansatz (3) dereguliert, d.h. deren Genexpression wird vermutlich durch Apoptoseinduktion mit hCD95L beeinflusst, da in beiden Ansätzen eine Probe apoptotischer Zellen mit einer Probe nicht-apoptotischer Zellen verglichen wurde (dicht ausgesäte Zellen sind gegenüber der hCD95L-induzierten Apoptose geschützt und daher nicht apoptotisch).

In den Tabellen 3.10 – 3.13 ist jeweils eine Auswahl unterschiedlich exprimierter Gene/mRNAs der einzelnen Ansätze aufgelistet. Bei der Auswertung wurde ein Filter gesetzt, d.h. es erscheinen nur jene Gene, deren Expression im Vergleich über 2,5-mal erhöht oder erniedrigt ist.

	Dünn - dicht (1)	Dünn hCD95L - dünn (2)	Dünn hCD95L - dicht hCD95L (3)	Dicht hCD95L - dicht (4)	1 und 3	2 und 3
gesamt	256	370	888	14	119	187
Expression erhöht	74	27	179	8		
Expression erniedrigt	182	343	709	6		

Tab. 3.10: Gesamtheit in dünn und dicht ausgesäten RKO-Zellen unterschiedlich regulierter Gene

Der Vergleich der Ansätze „dünn“ (1×10^6 pro Petri-Schale) und „dicht“ (1×10^7 pro Petri-Schale) zeigte Unterschiede in 256 mRNAs, davon waren 182 im „dünnen“ Ansatz herunter reguliert. Die Zugabe von 50 ng/ml hCD95L und anti-Flag-Antikörper reichte in den „dünnen“ RKO-Zellen aus, um 370 Gene zu beeinflussen, in den „dichten“ waren davon nur 14 Gene betroffen. Wurde in beiden Zuständen Apoptose ausgelöst, waren nun 888 der Gene unterschiedlich exprimiert.

1 und 3 Genbank Nr.	- eine Auswahl - Name mRNA	Signalstärke	
		Ansatz 1	Ansatz 3
AF279900.1	PNAS-146	+3,2	+4,3
NM_002692.1	DNA Polymerase E2	+3,5	+2,6
NM_001254.1	CDC6	+3,8	+3,3
U77949.1	Cdc6-related protein	+3,8	+3,0
NM_002061.1	Ligase, modifier subunit	+3,5	+4,8
NM_006107.1	acid-inducible phosphoprotein	+2,8	+2,9
NM_001237.1	cyclin A2	+2,8	+5,2
NM_005573.1	lamin B1	+3,9	+3,6
NM_004526.1	mitotin, MCM2	+4,0	+4,0
NM_001540.2	heat shock 27kD protein1	+2,5	+3,7
NM_002388.2	MCM3	+2,9	+2,5
NM_005345.3	heat shock 70kD protein 1A	+4,3	+3,9
U88964	HEM45	-4,0	-3,2
NM_019096.1	GTP binding protein	-5,5	-4,0
NM_030777.1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)	-6,3	-2,7
NM_014067.2	LRP16 protein	-4,0	-3,1
NM_021158.1	protein kinase domain containing protein similar to phosphoprotein C8FW	-7,8	-6,5
NM_021178.1	enhancer of invasion 10 (HEI-10)	-2,7	-7,6
NM_016061.1	CGI-127 protein	-3,6	-4,1
M19720	L-myc protein gene, complete cds	-2,8	-2,7
L49506.1	cyclin G2	-2,9	-3,1
M33653.1	collagen IV A2	-3,9	-3,0
AF021834.1	tissue factor pathway inhibitor beta (TFPI β)	-3,1	-3,6
U37546.1	IAP homolog C (cIAP2)	-17,5	-3,5
AB003476.1	Gravin	-2,6	-3,1
U19869.1	fatty acid binding protein (FABP)	-12,1	-15,8
U04897.1	orphan hormone nuclear receptor RORalpha1	-3,2	-2,5
AF019214.1	HMG box containing protein 1 (HMGB1)	-3,1	2,6
BC000498.1	aspartate aminotransferase 1	-4,4	-3,3
NM_000313.1	protein S alpha	-2,8	-2,9
NM_000050.1	argininosuccinate synthetase	-3,6	-2,6
NM_001671.1	asialoglycoprotein receptor 1	-4,3	-3,7
NM_015364.1	MD-2	-4,8	-5,7
NM_019844.1	organic anion transporter 8	-3,9	-4,7
NM_001902.1	cystathionase	-7,2	-5,9
NM_014398.1	similar to lysosome-associated membrane glycoprotein	-8,5	-9,2
NM_002830.1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type4	-2,5	-2,8
NM_005110.1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	-3,2	-2,6
NM_001673.1	asparagine synthetase (ASNS)	-7,0	-14,8
NM_002201.2	interferon stimulated gene	-6,9	-4,1
NM_005261.1	GTP-binding protein GEM	-3,0	-3,0
U86453.1	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit p110delta (PI3K p110)	-2,6	-7,8
NM_004563.1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	-3,7	-2,7
NM_002194.2	inositol polyphosphate-1-phosphatase	-2,5	-2,9
NM_004354.1	cyclin G2	-2,5	-3,4
NM_014456.1	programmed cell death 4 (PDCD4)	-3,7	-3,0
NM_014456.1	programmed cell death 4 (PDCD4)	-3,2	-2,9
NM_001674.1	activating transcription factor 3 (ATF3)	-3,2	-3,2

NM_004428.1	ephrin-A1	-6,4	-2,8
NM_000930.1	plasminogen activator, tissue (tPA)	-4,4	-4,9
NM_002345.1	lumican	-4,4	-9,6
NM_001731.1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	-2,9	-3,2
M61715.1	tryptophanyl-tRNA synthetase	-2,8	-2,7

Tab. 3.11: Viele Gene werden in „dünn“ ausgesäten Zellen in geringerem Ausmaß exprimiert als in „dicht“ ausgesäten RKO-Zellen

Es wurde eine Auswahl der in Ansatz 1 und Ansatz 3 gleichermaßen unterschiedlich regulierten mRNAs aufgelistet. Eine Signalstärke von Faktor +4 bedeutet z.B., dass das Signal dieses Gens in der „dünnen“ Probe 4mal höher war als in der „dichten“ Probe (Filter 2,5).

Dünn-dicht	- eine kleine Auswahl -	Signalstärke
Genbank Nr.	Name mRNA	
BC001441.1	similar to S-phase kinase associated protein2	+2,6
AB028869.1	survivin-beta	+2,8
L23928.1	SHMT (serine hydroxymethyltransferase)	+7,4
NM_004856.3	mitotic kinesin-like ptotein	+2,5
D50692.1	c-myc binding protein	+2,6
X69397.1	CD24 cell surface antigen	-4,8
NM_004723.1	rhovac (GEF)	-4,0
NM_006344.1	BCL2-like 1 (Bcl-x _L)	-3,1
NM_000177.1	gelsolin	-2,8
NM_006086.1	Tubulin, beta, 4 (TUBB4)	+ 2,5

Tab. 3.12: Nur in Ansatz 1 (dünn - dicht) unterschiedlich regulierte Gene

Es wurde eine Auswahl der nur in Ansatz 1 („dünn“ - „dicht“) beeinflussten mRNAs aufgelistet (Filter 2,5).

Dünn hCD95L-	dicht hCD95L	- eine kleine Auswahl -	Signalstärke
Genbank Nr.	Name mRNA		
NM_014244.1	disintegrin-like and metalloproteinase (ADAMTS2)		-9,1
BC005838.1	Tubulin, beta 5		+ 3,5
AF 141349.1	Beta-tubulin		+ 4,1
BC004188.1	Tubulin, beta, 2		+ 4,1
AFO15524.1	putative chemokine receptor CRAM-A		-3,9
U71088.1	MAP kinase kinase MEK5c		-9,8
U58828.1	IL8 related receptor		-5,9
AF221098.1	Ral guanine nucleotide exchange factor		-2,9
U71087.1	MAP kinase kinase MEK5b		-8,8
L18964.1	protein kinase C iota isoform (PKC _i)		-2,8
BC002794.1	TNF-R member 14 (LIGHT-R)		-6,3
NM_001447.1	FAT tumor suppressor homolog 2		-6,8
NM_003393.1	WNT8B		-9,6
NM_000641.1	IL11		-2,8
NM_021153.1	cadherin 19, type 2		-2,6
NM_002260.2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2		-16,8
NM_001243.1	TNF-R member 8 (CD30)		-2,9
NM_006344.1	macrophage lectin 2		-14,5

NM_001963.2	EGF	-4,3
NM_016155.1	MMP17 (membrane-inserted)	-6,2
NM_003841.1	TNF-R member 10c, decoy without intracellular domain (TRAIL-R3)	-3,1
NM_022804.1	SNURF	-4,2
NM_002658.1	plasminogen activator, urokinase (uPA)	-7,7
NM_002309.2	LIF	-8,3
NM_002937.1	ribonuclease, Rnase A family, 4	-5,0
NM_001145.1	angiogenin, Rnase A family, 5	-8,3
NM_015320.1	Rho (GEF)	-3,6
NM_001924.2	GADD45A	-10,8
NM_000599.1	IGFBP5	-2,6
AB020966.1	hMet	-2,9
NM_002291.1	laminin, beta 1	-3,2
NM_024494.1	wnt2b	-4,9

Tab. 3.13: Nur in Ansatz 3 (dünn hCD95L – dicht hCD95L) unterschiedlich regulierte Gene

Es wurde eine Auswahl der nur in Ansatz 3 („dünn hCD95L“ – „dicht hCD95L“) beeinflussten mRNAs aufgelistet (Filter 2,5).

Es fällt auf, dass viele zellzyklusrelevante Gene im Vergleich „dünn – dicht“ dereguliert waren, was mit dem Zellzyklusarrest dichter Zellen konform geht.

An der Apoptoseprotektion dicht ausgesäter RKO-Zellkulturen könnten Bcl-x_L sowie cIAP2 maßgeblich beteiligt sein. Eine höhere Bcl-x_L-Proteinexpression war bereits in vorangegangenen Western Blot-Analysen gezeigt worden. Zudem wurde die katalytische Untereinheit der PI3K in der dichten Zellpopulation stärker exprimiert als in der dünnen Zellpopulation.

Die Ergebnisse der Zytokinarray-Analyse wurden bestätigt, denn Angiogenin und LIF wurden auch auf RNA-Niveau verstärkt exprimiert. Viele weitere an Migrationsprozessen beteiligte Genprodukte fielen auf, z.B. tPA, uPA, MMP17, CD24, Rho-Rac, die alle in dünn ausgesäten RKO-Zellen zu einem wesentlich geringeren Teil exprimiert wurden als in konfluenten RKO-Zellen.

Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass dicht gewachsene Zellen nicht nur dichtearretiert sind, sondern auch Prozesse zur Angiogenese und Migration einleiten.

4 Diskussion

4.1 Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose muristeronbehandelter RKO-Zellen

4.1.1 Die natürliche Funktion der Ecdysone

Das Steroidhormon Ecdyson reguliert Zelldifferenzierung und Zelltod während der Metamorphose der Insekten, beispielsweise von *Drosophila melanogaster*. Dabei reguliert es direkt oder indirekt die Transkription beteiligter Gene, wie z.B. der apikalen Caspase DRONC, welche für den ecdysonvermittelten Zelltod essentiell ist (Cakouros et al. 2002). Bei diesem Zelltod handelt es sich um Autophagie, eine Sonderform des programmierten Zelltodes, der sich morphologisch von der Apoptose unterscheidet. Ecdyson aktiviert Autophagie, um das Larvengewebe, das nicht länger benötigt wird, zu entfernen (Myohara 2004).

4.1.2 Das ecdysoninduzierbare Genexpressionssystem

Steroide sind kleine lipophile und zellpermeable Moleküle, die schnell metabolisiert (und somit entfernt) werden. Das macht sie zu idealen Induktoren für ein Genregulationssystem. Muristeron ist ein pflanzliches Ecdysonanalogon, das benutzt wird, um die Expression des zu untersuchenden Gens eines ecdysoninduzierbaren Säuger-Expressionsvektors auszulösen. Weitere Ecdysonhomologe, die als Induktoren verwendet werden, sind Ponasteron und das synthetisch hergestellte GS-E.

Das Ecdysonsystem (Firma *Invitrogen*) dient der kontrollierten Expression eines zu untersuchenden Gens in Säuger-Zellen. In diesem System werden beide Untereinheiten des funktionellen *Drosophila* Ecdysonrezeptors konstitutiv von einem Regulator-Vektor (pVgRXR) exprimiert. Der durch Ecdyson aktivierte Promotor, welcher letztendlich die Expression des zu untersuchenden Gens auslöst, ist auf einem zweiten induzierbaren Expressionsvektor lokalisiert. Die Säuger-Zellen werden mit diesem induzierbaren Expressionsvektor und dem pVgRXR-Konstrukt ko-transfiziert. In Anwesenheit des Induktors (Ecdyson bzw. Analoge), bindet der funktionelle Ecdysonrezeptor an das synthetische „Response-Element“, welches nicht von natürlichen Nuklearhormonrezeptoren erkannt wird und löst die Expression des zu untersuchenden Gens aus (Saez et al. 2000).

4.1.3 Die ecdysonbedingte Hemmung des CD95-Signalweges beginnt auf der Ebene der Caspase-8-Aktivierung

Die Aktivierung eines muristeroninduzierbaren p27-Expressionskonstruktes in RKO-Zellen führt zu einer deutlichen Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose. Allerdings stellte sich im Verlauf dieser Arbeit heraus, dass der anti-apoptotische Effekt durch Muristeronzugabe ausgelöst wird und von der p27-Expression unabhängig ist. Die Inkubation der RKO-Zellen mit Muristeron erhöht zum einen die Bcl-x_L-Proteinexpression. Dieses anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied ist vermutlich an der muristeronbedingten Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose in RKO-Zellen beteiligt. Bcl-x_L heterodimerisiert mit pro-apoptotischen Familienmitgliedern wie z.B. Bax und Bak und blockiert damit deren apoptotische Aktivität, d.h. es kommt nicht zur Freisetzung des Cytochrom c aus den Mitochondrien (Kirkin et al. 2004). Interessanterweise führt die Behandlung der RKO-Zellen mit Muristeron nicht zur caspasebedingten Spaltung des Bcl-x_L-Proteins (Kirsch et al. 1999 und eigene Daten), was dessen anti-apoptotischen Einfluss weiter erhöht. Bcl-x_L wird transkriptionell durch NF-κB oder STAT5 aktiviert (Zörnig et al. 2001). Unter Umständen resultiert die muristeronbedingte Überexpression aus einer indirekten Aktivierung dieser Signalwege.

Die muristeronbedingte Protektion der hCD95L-induzierten Apoptose ist bereits bei der Caspase-8-Aktivierung in den muristeronbehandelten RKO-Zellen nachweisbar, obwohl Caspase-8 nach Muristeronbehandlung sehr wohl in den CD95-DISC rekrutiert wird. Da einerseits in RKO-Zellen FLIP in der Western Blot-Analyse nicht nachweisbar ist, andererseits aber für eine anti-apoptotische Wirkung die Menge an c-FLIP in der Größenordnung der vorhandenen Caspase-8-Menge liegen muss (Scaffidi et al. 1999), liegt die Ursache der Protektion vermutlich nicht in einer Inhibition der Caspase-8-Aktivierung auf dem Level des DISC-Komplexes durch c-FLIP-Protein begründet. Möglicherweise spielen die Kinasen PI3K und PKC eine wichtige Rolle. So konnten Kauffmann-Zeh et al. 1997 bereits zeigen, dass die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) und der Kinase Akt die Caspase-8-Aktivierung vermutlich am DISC verhindert. Rohn et al. beschrieben 1998 eine Inhibition der CD95-induzierten Apoptose durch Akt auf der Ebene der Caspase-8-Aktivierung nach Rekrutierung zum DISC durch das Adaptorprotein FADD (Rohn et al. 1998). Die Aktivierung der PKC durch PMA verhindert ebenfalls die CD95-bedingte Caspase-8-Aktivierung im CD95-DISC (Gomez-Angelats & Cidlowski 2001).

Allerdings sollte dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass die aktive Caspase-3 die Aktivierung der Caspase-8 verstärken kann („Feedback Loop“; Slee et al. 1999). Somit könnte die Hemmung des CD95-Apoptosesignalweges auch alleine damit erklärt werden, dass die durch Bcl-x_L gehemmte

Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien und die dadurch verminderte Caspase-3-Aktivität die Caspase-8-Aktivierung durch Caspase-3 verhindert.

4.1.4 PKC und PI3K und ihre Rolle in der ecdysonvermittelten Protektion der hCD95L-induzierten Apoptose

Die PI3-Kinase aktiviert die Akt/PKB-Kinase, die ihrerseits Zielproteine wie MDM2, mTOR, GSK3 β , NF- κ B, FKHR, p27 und Bad phosphoryliert. Dies resultiert in Proliferation und Apoptoseinhibierung. Die PI3K kann durch noch ungeklärte Mechanismen in manchen Zelltypen PKC in Akt-unabhängiger Weise aktivieren (Vivanco & Sawyers 2002).

Die Hemmung der PI3K hat eine vollständige Aufhebung des durch Muristeron verursachten Protektionseffektes zur Folge. Dies zeigt die Inkubation der Zellen mit Ly294002 und Wortmannin. Ein Akt-Inhibitor hebt die Protektion ebenfalls auf, was vermuten lässt, dass die Ecdysonhomologe über die PI3K- bzw. Akt-Aktivierung die Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose auslösen. Gouilleux et al. konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls einen unerwarteten Nebeneffekt der Ecdysonhomologe über die Aktivierung der Akt-Kinase nachweisen (Constantino et al. 2001). Diese Information war zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch noch nicht publiziert.

Die Inkubation der RKO-Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA hat, vermutlich über eine Induktion des Zellzyklusinhibitors p21, einen G0/G1-Zellzyklusarrest zur Folge. Park et al. erklären diesen PMA-Effekt über eine PKC-vermittelte Stabilisierung der p21-mRNA (Park et al. 2001). Zudem inhibiert PMA die CD95-vermittelte Apoptose in RKO-Zellen. Gomez-Angelats et al. begründen diese Protektion mit der PKC-vermittelten Hemmung der Caspase-8-Aktivierung, deren genauer molekularer Mechanismus unbekannt ist (Gomez-Angelats et al. 2000).

Das Ecdysonhomolog Muristeron hemmt nur zum Teil über eine PKC-Aktivierung die CD95-vermittelte Apoptose. Eine Inhibierung der Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen durch Inkubation mit dem Inhibitor Gö6976 hebt zwar den Protektionseffekt in den muristeroninduzierten p27-überexprimierenden RKO-Zellen völlig auf, aber erstaunlicherweise nicht die muristeronbedingte Protektion der CD95-vermittelten Apoptose in RKO-Wildtypzellen. Dies bedeutet, dass die Aktivierung der PKC vermutlich nicht alleine für die Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose durch Muristeron verantwortlich ist. Es werden zusätzlich weitere Signale für die Protektion benötigt, die möglicherweise bei p27-Überexpression wieder aufgehoben werden. Solche Signale könnten z.B. Proliferationssignale sein, die durch einen Zellzyklusarrest wieder aufgehoben werden. Die Hemmung des anti-apoptotischen PI3K-Akt-Signalweges etwa hat einen Zellzyklusarrest der Zellen zur Folge,

während die Aktivierung dieses Signalweges u.a. zur p27-Phosphorylierung und Inaktivierung führt, was eine verstärkte Proliferation zur Folge hat (eigene Daten und Liang et al. 2002).

Gegen diese Theorie der apoptoseunterstützenden Wirkung eines G0/G1-Arrestes spricht jedoch, dass PMA, welches ebenfalls einen G0/G1-Arrest der RKO-Zellen bedingt, die CD95-Apoptosesignalkaskade hemmt. Der Unterschied könnte hier in der p21-Expression liegen, d.h. vielleicht führt p21 im Gegensatz zu p27 zur Protektion der Zellen. Suzuki et al konnten einen entsprechenden apoptosehemmenden Effekt von p21 zeigen (Suzuki et al. 1998). Allerdings kann p21 auch pro-apoptotisch wirken (Wu et al. 2002; eigene Daten). Mit dieser Erklärung erscheint die Beobachtung unvereinbar, dass p27-überexprimierende Tumore sich grundsätzlich apoptoseinsensitiv verhalten (Lloyd et al. 1999).

4.1.5 Das Steroidhormon Muristeron beeinflusst die Genexpression in RKO-Zellen

Ecdysone sind Steroidhormone, die in Insekten ihre Aufgabe über die Regulierung von transkriptionellen Ereignissen erfüllen. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit den *Affymetrix* Chips (HG-U95A) zeigen, dass muristeronbehandelte RKO-Zellen Unterschiede in der Genexpression einiger Gene aufweisen. Dabei erscheinen jedoch nur drei Gene in beiden muristeronbehandelten Ansätzenⁱ im Vergleich zu den unbehandelten Zellen dereguliert (DYRK, MNB, Oligophrenin-1), wobei DYRK und MNB durch die Muristeronbehandlung schwächer exprimiert werden und Oligophrenin-1 stärker exprimiert wird. Alle drei Gene stehen mit Trisomie 21 im Zusammenhang und werden hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Allerdings zeigten Leder et al., dass verschiedene DYRK-Spleißvarianten auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert werden (Leder et al. 2003). DYRK ist ein Homolog des *Drosophila mnb*ⁱⁱ-Gens (Song et al. 1996). Die DYRK-Proteinkinasefamilie ist an der Regulation von Wachstum und Entwicklung in Säugern, *Drosophila* und niederen Eukaryonten beteiligt. DYRK1B agiert als transkriptioneller Aktivator und vermittelt serumfreies Wachstum von Kolonkarzinomzellen. DYRK1B erhöht zusätzlich durch posttranskriptionale Ereignisse den proteasombedingten Abbau von p27 und Cyclin D1, was zu verstärkter Proliferation führt (Ewton et al. 2003). Die nukleäre Proteinkinase DYRK1A interagiert direkt als Ko-Aktivator mit dem Forkhead-Transkriptionsfaktor FKHR. Überlebenssignale (Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase durch Wachstumsfaktoren) führen PI3K-abhängig zur Akt-katalysierten Phosphorylierung von FKHR an drei Aminosäureresten. Dies wiederum resultiert in der Translokation des FKHR in das Zytosol, wo der

ⁱ Ansatz 1: Muristeron – unbehandelt

Ansatz 2: Muristeron, hCD95L, anti-Flag-AK - unbehandelt

ⁱⁱ mnb: minibrain

Transkriptionsfaktor inaktiv ist. DYRK1A phosphoryliert Akt-unabhängig einen vierten Aminosäurerest, was ebenfalls zu einer Inaktivierung des Forkhead-Transkriptionsfaktors führt (Woods et al. 2001). DYRK3 hemmt die Apoptose (ausgelöst durch Wachstumsfaktorentzug) in hämatopoetischen FDCW2-Zellen (Li et al. 2002). Möglicherweise besteht über DYRK-bedingte Phosphorylierungsereignisse ein Zusammenhang zur apoptosehemmenden Wirkung der Ecdyson-homologe.

Die MNB-Kinase ist das humane Homolog zur *Drosophila* mnb-Kinase und ist wichtig für die postembryonale Neurogenese (Guimera et al. 1996). Es sind bisher keine Daten über einen Zusammenhang zwischen MNB und Apoptose publiziert worden.

Oligophrenin-1 ist ein Protein der GAPⁱ-Familie, welches ubiquitär exprimiert wird. Mutationen in diesem Gen werden mit Trisomie 21 in Verbindung gebracht. Oligophrenin-1 wird jedoch auch in kolorektalen Tumoren überexprimiert (Pinheiro et al. 2001). Oligophrenin-1 kodiert für ein Rho-GTPase-aktivierendes Protein (rhoGAP), welches die Hydrolyse von GTP zu GDP bedingt und somit Ras inaktiviert. Ras-aktivierte Signalwege können je nach Ko-Faktoren und Umgebung bzw. Lokalisierung sowohl anti- als auch pro-apoptotisch wirken (Hancock 2003).

Interessanterweise wurde in einer der beiden untersuchten muristeronbehandelten Proben das IL-8 Gen im Vergleich zur unbehandelten Probe 12-mal stärker exprimiert. IL-8 ist ein Zytokin, welches an Angiogenese- und Migrationsprozessen beteiligt ist (Huang et al. 2000, Mills et al. 2002). Abdollahi et al. konnten eine anti-apoptotische Wirkung des IL-8 nachweisen (2003). Dabei behandelten sie OVCAR3ⁱⁱ-Zellen mit IL-8 und lösten Apoptose durch die Inkubation der Zellen mit TRAIL aus. IL-8 inhibierte, über Beteiligung des MAPK-Signalweges, die TRAIL-induzierte Apoptose (Abdollahi et al. 2003). Allerdings inhibiert in den vorliegenden Untersuchungen das rekombinante Zytokin unter entsprechenden Versuchsbedingungen nicht die CD95-vermittelte Apoptose in den RKO-Zellen.

Muristeron erhöht (ebenfalls nur in einer der beiden muristeronbehandelten Proben) im Vergleich zur unbehandelten Probe die Expression der MAPK-Kinase 3b um das 3-fache. Der MAPK-Signalweg ist ein Signalweg, der zu Proliferation und Zellüberleben führt. Somit könnte auch hierin ein Mechanismus zur Protektion der CD95-vermittelten Apoptose nach Muristeronbehandlung liegen.

Auffallend ist die 16-fache Überexpression der Retinoldehydrogenase (Retinol-DH) in muristeronbehandelten RKO-Zellen (in denen nicht Apoptose ausgelöst wurde) im Vergleich zu der

ⁱ GAP: GTPase Accelerating Protein

ⁱⁱ OVCAR: ovarian carcinoma

unbehandelten Probe. Die Aufgabe der Retinol-DH besteht darin, Retinal zu Retinol zu reduzieren. Aus Retinal kann durch Oxidation aber auch Retinoat gebildet werden. Eine Isomerase unterstützt die Bildung des 9-cis-Retinoat, welches an den RXR-Rezeptor bindet (Rehner & Daniel 1999). Dieser heterodimerisiert u.a. mit dem Ecdysonrezeptor und löst so die Transkription von Zielgenen aus. Vielleicht führt die Behandlung der Zellen mit Muristeron über einen RXR-vermittelten Weg zu transkriptionellen Ereignissen, die in einer Rückkopplungsreaktion die Transkription der Retinol-DH nach sich ziehen.

Zusätzlich wird das Onkogen *dbl* in muristeronbehandelten Zellen in einem der beiden Vergleiche zu unbehandelten Zellen 5-fach höher exprimiert. Dbl gehört zur Familie der GEFsⁱ und führt zur Aktivierung von Rho-GTPasen. Somit aktiviert Dbl womöglich Signalwege, die zum Verlust der Apoptosesensitivität führen (Zheng 2001).

MINORⁱⁱ, ein Mitglied der Familie der nukleären Orphanⁱⁱⁱ-Rezeptoren, deren Liganden unbekannt sind, wird durch Muristeron um das 16-fache überexprimiert. MINOR ist durch Mitogene in einer Vielzahl von Zelltypen induzierbar (Hedvat & Irving 1995). Dies führt zu der Spekulation, dass MINOR evtl. nach Bindung des Ecdysonhomologs an Transkriptionsprozessen beteiligt sein könnte.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Muristeron die Akt-Kinase aktiviert, die Bcl-x_L-Expression erhöht, die Caspase-8-Aktivierung und mitochondriale Ereignisse (MMP^{iv}-Depolarisierung, Cytochrom c-Freisetzung) verhindert und somit die hCD95L-induzierte Apoptose in RKO-Zellen blockiert. Zusätzlich beeinflusst das Steroidhormon auch das Genexpressionsmuster der behandelten Zellen, was ebenfalls für die Hemmung der Apoptose mit verantwortlich sein könnte. Um dies weiter zu klären müsste im nächsten Schritt die unterschiedliche Expression auch auf RNA-Ebene („Real-Time“-PCR) und Protein-Ebene (Western Blot-Analysen) bestätigt werden.

Somit ist das ecdysoninduzierbare Genexpressionsystem zur Apoptoseuntersuchung in RKO-Zellen nicht verwendbar und die festgestellten Ergebnisse über eine Apoptoseprotektion sind vermutlich allesamt auf die Inkubation mit dem Ecdyson-Analogen und nicht auf die p27-Überexpression zurückzuführen.

ⁱ GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor

ⁱⁱ MINOR: Mitogen-Inducible Nuclear Orphan Receptor

ⁱⁱⁱ orphan: engl. Waise

^{iv} MMP: Mitochondriales Membran Potential

4.2 Weitere Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen in RKO-Zellen

4.2.1 Etablierung induzierbarer p27-Zellklone mit dem Genexpressionssystem der Firma

ARIAD

Der für das induzierbare Genexpressionssystem der Firma *ARIAD* benötigte synthetische Induktor AP21967 hat keinerlei Auswirkungen auf RKO-Zellen und ihr Apoptoseverhalten. Jedoch ist bis auf den RKO10-Zellklon keiner der erhaltenen Klone nach Repassagierung noch induzierbar. Der Proteinsynthesememmer Cycloheximid (CHX), der zur Unterstützung der Apoptoseinduktion mit hCD95L in TypII-Zellen mit verwendet wird, hat per se (in der benutzten Konzentration) keinen Effekt auf die RKO-Zellen. Die RKO10-Zellen lassen sich jedoch durch eine Behandlung mit Cycloheximid und AP21967, aber auch mit CHX alleine zu 80% in der G0/G1-Zellzyklusphase arretieren, während sich ohne CHX-Behandlung nur 48% der RKO10-Zellen in der G0/G1-Phase befinden. Dabei ist allerdings nicht gewährleistet, dass dieser detektierte G0/G1-Arrest auch tatsächlich in einer induzierten p27-Überexpression begründet liegt. Möglicherweise führt Cycloheximid direkt oder indirekt in seiner Funktion als Proteinsyntheseinhibitor zur Induktion des Genexpressionssystems. So deuten in dieser Arbeit nicht gezeigte Daten daraufhin, dass eine CHX-Behandlung zur erhöhten Expression der NF- κ B-p65-Untereinheit führt (Array-Daten). Die Aktivierungsdomäne des induzierbaren Genexpressionssystems setzt sich ebenfalls aus der NF- κ B-p65-Untereinheit zusammen. Möglicherweise führen jene Mechanismen, die zur erhöhten p65-Genexpression führen, auch zur Induktion des Systems über die Aktivierungsdomäne.

Andererseits hemmt CHX eventuell direkt die Biosynthese eines Faktors, der seinerseits die p27-Expression inhibiert. Gegen die Annahme, dass CHX am Auslösen des induzierbaren Genexpressionssystems beteiligt ist, spricht, dass in der Western Blot-Analyse die RKO10-Zellen in allen Zuständen, also auch im unbehandelten Zustand, eine höhere p27-Expression aufweisen als die RKO-Wildtypzellen. Dies lässt auf ein „undichtes“ Genexpressionssystem mit basaler p27-Expression schließen. Da die RKO10-Zellen bereits im unbehandelten Zustand gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose resistent sind, eignen sie sich nicht zur weiteren Apoptoseanalyse.

4.2.2 Transiente p21- bzw. p27-Überexpression beeinflusst nicht die CD95-vermittelte Apoptose

Die Transfektionsexperimente in RKO- und 293T-Zellen mit transienter Überexpression von p21 bzw. p27 zeigen, dass p21 pro-apoptotisch wirkt und keinen weiteren Effekt auf die CD95-vermittelte Apoptose hat. Ein Vergleich dieser Daten mit anderen Studien zeigt eine Bestätigung dieses Effektes durch Wu et al., die ebenfalls eine pro-apoptotische Wirkung des p21 postulieren (Wu et al. 2002). Dagegen beschreiben Suzuki et al. eine anti-apoptotische Wirkung des p21 (Suzuki et al. 1999). Sie konnten beobachten, dass das zytoplasmatische p21 an die Procaspase-3 an den Mitochondrien bindet und somit die Prozessierung zur aktiven Caspase-3 verhindert (Suzuki et al. 1999). Diese Daten sind allerdings umstritten. Des Weiteren resultiert die Überexpression einer ausschließlich zytoplasmatisch vorliegenden p21-Mutante in einer Apoptoseresistenz (Asada et al. 1999, Coqueret 2003), und ein *p21*-knock out in Kolonkarzinomzellen hat die Apoptose der Zellen zur Folge (Coqueret 2003). Somit scheinen weitere Faktoren wesentlich an der anti- oder pro-apoptotischen Funktion des p21 beteiligt zu sein, möglicherweise spielt auch die Lokalisierung (Nukleus oder Zytosol) dabei eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass die transiente p27-Überexpression keinen Einfluss auf die hCD95L-induzierte Apoptose hat. p27 wird normalerweise durch ein anti-mitogenes Signal aktiviert, woraufhin es die Cyclin E/Cdk2-Kinase hemmt. Differenzierte Zellen bzw. Zellen in der G₀-Phase besitzen erhöhte Mengen an p27. Mitogene Signale führen über Reduzierung der p27-Mengen zum Wiedereintritt in den Zellzyklus (Swanton 2004). In proliferierenden Zellen liegt p27 an Cyclin D/Cdk4/6 gebunden vor. Diese Komplexe sind trotzdem katalytisch aktiv, und p27 wird so inaktiviert (und Cdk2 freigesetzt). Der aktive Cyclin E/Cdk2-Komplex führt zum Eintreten in die S-Phase und damit zu einer Zellzyklusprogression (Swanton 2004).

Es gibt viele Studien, die eine anti-apoptotische Wirkung des p27-Proteins beschreiben. Dies zeigt sich deutlich darin, dass p27-überexprimierende und dadurch sehr langsam wachsende Tumore resistent gegenüber chemotherapeutischen Substanzen sind (St Croix et al. 1996, Lloyd et al. 1999, Yang et al. 2000). Niedrige p27-Spiegel dagegen sind ein Merkmal schnell wachsender und aggressiver Tumoren. Dennoch gibt es auch Publikationen, in denen eine pro-apoptotische p27-Wirkung beschrieben wird. Supriatno et al. (2002) zeigen in einer Krebszelllinie und Barata et al. (2001) in T-Zellen eine Apoptoseinduktion durch eine p27-Überexpression. Wahrscheinlich spielen Zelltyp sowie die Beteiligung von zusätzlichen Faktoren eine Rolle dafür, ob letztendlich Apoptose entweder inhibiert oder sogar induziert wird. Interessanterweise phosphoryliert die anti-apoptotische Akt-Kinase p27 an

Threonin 157 in der Kernlokalisierungssequenz des Proteins. Dadurch bleibt p27 im Zytoplasma, Cdk2 wird nicht komplexiert und induziert seinerseits die Proliferation der Zelle (Swanton 2004).

Die CDK-Inhibitoren besitzen jedoch auch zusätzlich CDK-unabhängige Funktionen:

p27 und p21 erhöhen die Mengen an Cyclin D im Nukleus, indem sie den Import des Cyclins erleichtern und den Export hemmen (Coqueret 2003). Zudem wird in einigen Studien vermutet, dass p21 und p27 auch als Transkriptionsfaktoren funktionieren können (Coqueret 2000). Daher ist die transiente Überexpression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 möglicherweise nicht geeignet, um den Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Apoptose zu untersuchen, da sie weitere zellzyklusunabhängige Aufgaben erfüllen. Dies bedeutet, dass ein Effekt der CDK-Inhibitoren auf die CD95-vermittelte Apoptose nicht unbedingt im engen Zusammenhang mit dem Zellzyklusarrest stehen muss. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die transiente Überexpression von p21 bzw. p27 in RKO- und 293T-Zellen keinen Effekt auf die CD95-Apoptosesignalkaskade hat und dass die Überexpression von p21 in diesen Zellen, ohne weitere apoptoseauslösende Stimuli zu benötigen, zur Apoptose führt.

4.2.3 Synchronisationsexperimente

Die Synchronisationsexperimente mit arrestauslösenden Substanzen (z.B. Mimosin, Aphidicolin und Genistein) sind ebenfalls nicht zur Analyse der Zellzyklusabhängigkeit CD95-vermittelter Apoptose geeignet, da die jeweiligen Substanzen in Signaltransduktionswege eingreifen und somit selbst die Apoptoseregulation beeinflussen (eigene Beobachtungen, Baxa & Yoshimura 2003, Wei et al. 2003). Somit sind Veränderung im Apoptoseverhalten der mit arrestauslösenden Substanzen behandelten RKO-Zellen nicht eindeutig auf den Zellzyklusarrest bzw. die jeweilige Zellzyklusphase zurückzuführen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich NIH 3T3-Zellen durch Serumentzug in der G0/G1-Zellzyklusphase arretieren und somit synchronisieren lassen. Zum einen führt die Zugabe von Serum zur Proliferation, indem etwa die Cyclin D-Expression induziert und p27 inaktiviert wird, aber auch, indem Mitogene des Serums den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren. Nach Zugabe von frischem serumreichen Medium zu den NIH 3T3-Zellen beginnen diese synchron zu proliferieren. Allerdings haben die Zellen ihre Apoptosesensitivität verloren, ein interessantes Phänomen, das weiter untersucht werden sollte.

4.2.4 Proliferierende Zellen sterben möglicherweise aus einer bevorzugten Zellzyklusphase heraus

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Zellzyklusverteilung überlebender Zellen nach hCD95L-Behandlung zeigen eine Anreicherung dieser Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase, die auch auftritt, wenn kein CHX zur zusätzlichen Sensitivierung für die Apoptoseinduktion verwendet wird. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben:

Möglicherweise besteht die CD95-vermittelte Apoptose aus zwei Schritten. Im ersten Schritt werden die Zellen im Zellzyklus in der G0/G1-Phase angehalten und in einem zweiten Schritt wird dann die eigentliche Apoptosesignalkaskade aktiviert. Die in dieser Analyse untersuchten überlebenden bzw. noch nicht apoptotischen Zellen würden sich demnach noch im apoptosevorbereitenden ersten Schritt befinden und wären daher in der G0/G1-Phase arretiert. Yamasaki et al. konnten einen ähnlichen Mechanismus in der Staurosporin-vermittelten Apoptose aufzeigen. Staurosporin induziert zunächst einen Arrest in der G2/M-Zellzyklusphase der Zellen (oder in der G1-Phase, je nach Konzentration des Staurosporins), bevor letztendlich die Apoptose der Zellen ausgelöst wird (Yamasaki 2003). Auch für TNF α -vermittelte Signale gibt es entsprechende Beobachtungen. Hu et al. beschreiben einen G1-Arrest der Zellen nach TNF α -Aktivierung, welcher daraufhin von Apoptose begleitet wird (Hu et al. 2002). Tatsächlich postulieren Hingorani et al., dass eine CD95-Aktivierung in T-Zellen eine DISC- bzw. FADD- und Caspase-8-vermittelte Induktion des p21-Protein mit apoptoseunterstützender Wirkung nach sich zieht (2000). Ob dieser Mechanismus auf die CD95-vermittelte Apoptose in RKO-Zellen zutrifft, ließe sich durch eine Western Blot-Analyse der Gesamtzelllysate lebender, mit hCD95L-behandelter Zellen mit einem anti-p21-Antikörper überprüfen. Zusätzlich könnten z.B. nach Transfektion von Cyclin D konstitutiv proliferierende Zellen auf ihre Apoptoseinduzierbarkeit hin untersucht werden. Gegen diese Zweischritt-Theorie spricht allerdings, dass inzwischen einige Studien proliferationsfördernde und apoptoseunabhängige Eigenschaften des CD95-Rezeptors und seiner Signalmoleküle zeigen konnten (Zörnig et al. 1998, Kennedy et al. 1999, Strasser & Newton 1999).

Eine zweite und wahrscheinlichere Erklärung für die Ansammlung hCD95L-behandelter und überlebender Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase könnte darin bestehen, dass RKO-Zellen präferentiell aus der S-Phase heraus nach CD95-Stimulation in die Apoptose gehen. Lissy et al. (1998) beschreiben eine Apoptosesensitivität von T-Zellen in der späten G1-Phase bzw. am Übergang von der G1 zur S-Zellzyklusphase. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der

Caspase-3-Aktivität der RKO-Zellen nach hCD95L-Behandlung zeigt allerdings keine signifikante Erhöhung der Caspaseaktivität in Zellen der S-Zellzyklusphase.

Eine dritte Erklärung könnte sein, dass hCD95L-behandelte RKO-Zellen präferentiell aus der G2/M-Zellzyklusphase sterben. Die Anreicherung in der G0/G1-Phase geht auch tatsächlich mit einem stärkeren Rückgang von Zellen in der G2/M-Phase als von Zellen der S-Phase einher (vgl. Abb. 3.33). Zudem erhöht sich der Anteil Caspase-3-aktiver Zellen in der G2/M-Zellzyklusphase im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollpopulation, während sich der Anteil der Zellen mit aktiver Caspase-3 in der G0/G1-Phase erniedrigt (vgl. Abb. 3.34). Gegen die Vermutung, dass RKO-Zellen bevorzugt aus der G2-Zellzyklusphase heraus sterben, sprechen die Ergebnisse der durchgeführten Cyclin B1-Messung. Cyclin B1 ist ein für die G2-Phase wichtiges Cyclin. Die Messung zeigt, dass Cyclin B1-positive Zellen tatsächlich in den S/G2/M-Phasen vorliegen, aber diese Zellen nach hCD95L-Behandlung, entgegen der obigen Hypothese, zu einem geringeren Anteil sterben (vgl. Abb. 3.36).

Cyclin E ist am Übergang von der G1-Phase zur S-Phase aktiv. Würden RKO-Zellen, die sich in der S-Phase befinden bzw. am Übergang von der G1- zur S-Phase, sensitiver gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sein als Zellen in anderen Zellzyklusphasen (Hypothese 2), dann müssten auch die Cyclin E-positiven Zellen sensitiver reagieren, dies ist jedoch nicht der Fall. Somit sprechen die erzielten Resultate gegen die Hypothese einer erhöhten Apoptosesensitivität der DNA-synthetisierenden Zellen in der S-Phase. Der aktive Cyclin E/Cdk2-Komplex bedingt eine weitere Phosphorylierung des Rb-Proteins und damit die Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors, welcher die Transkription proapoptotischer Moleküle wie z.B. Apaf-1 induziert (Moroni et al. 2001). In dieser Arbeit zeigen sich Cyclin E-positive RKO-Zellen jedoch nicht apoptosesensitiver als Cyclin E-negative Zellen.

Interessanterweise sterben Cyclin D-positive und Cyclin D-negative Zellen im gleichen Ausmaß nach einer Inkubation der RKO-Zellen mit hCD95L. Dies bedeutet, dass hier kein Unterschied zwischen proliferierenden (Cyclin D positiv) und zellzyklusarretierten Zellen der G0-Phase (Cyclin D negativ) besteht. Die Cyclin D-Messung zeigt, dass Cyclin D-positive Zellen über alle Zellzyklusphasen verteilt vorliegen, obwohl Cyclin D nur in der G1-Phase benötigt wird, während Cyclin D-negative Zellen hauptsächlich in der G0/G1-Phase detektiert werden (vgl. Abb. 3.36).

Es ist auffallend, dass der Gesamtanteil (lebend + sterbend) cyclinexprimierender Zellen nach Apoptoseinduktion mit hCD95L abnimmt. Während in der unbehandelten Population $54 \pm 12\%$ der Zellen Cyclin B1 exprimiert, reduziert sich dieser Anteil nach einer Behandlung mit hCD95L auf $45 \pm 14\%$. Noch deutlicher zeigt sich dies in der Cyclin E-exprimierenden Zellpopulation, die ohne

hCD95L-Behandlung $57 \pm 21\%$ beträgt, danach jedoch nur noch fast die Hälfte, nämlich $31 \pm 14\%$. Diese Tendenz ist auch in Cyclin D-exprimierenden Zellen, jedoch in geringerem Ausmaß, zu erkennen: in $84\% \pm 18\%$ der unbehandelten Zellen ist Cyclin D nachweisbar, während nur $79 \pm 13\%$ der hCD95L-behandelten Zellen Cyclin D-positiv sind. Interessanterweise sind nach einer Inkubation mit hCD95L nur 4% der Cyclin B1-positiven Zellen apoptotisch im Vergleich zu 14% der Cyclin B1-negativen Zellen. Entsprechend sind nur 8% der Cyclin E-exprimierenden Zellen tot im Vergleich zu 29% der Cyclin E-negativen Zellen. Cyclin D3-positive wie negative Zellen sterben nach hCD95L-Behandlung im Mittel zu 17%. Dies könnte bedeuten, dass u.a. die Cycline B1 und E während der Apoptose z.B. durch eine caspasebedingte Spaltung abgebaut werden, da sich der Gesamtanteil Cyclin-exprimierender Zellen in der hCD95L-behandelten Zellpopulation im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation verringert hat und apoptotische Zellen nur zu einem geringen Anteil Cyclin B1 oder E besitzen. So resultiert der von Hu et al. beschriebene TNF α -vermittelte G1-Arrest in einem proteasom-abhängigen Abbau des Cyclin D (Hu et al. 2002). Entsprechend könnte vermutet werden, dass der CD95-Signalweg zum Abbau von Cyclin E und Cyclin B1 führt. Dabei bleibt jedoch die Frage offen, ob der Abbau eine Konsequenz der Caspaseaktivierung oder aber ein Ereignis ist, welches vor der Apoptosesignalkaskade ausgeführt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass überlebende Zellen nach hCD95L-Behandlung vermehrt in der G0/G1-Zellzyklusphase nachweisbar sind, während apoptotische Zellen aus der G2/M-Phase heraus sterben. Allerdings besitzen apoptotische Zellen kaum Cyclin B1, ein für die G2-Phase wichtiges Cyclin, was bereits in der späten S-Phase bis in die frühe M-Phase hinein exprimiert wird. Somit wird die These, dass proliferierende Zellen der G2/M-Phase sensitiver auf CD95L-induzierte Apoptose reagieren, nicht bestätigt. Nichtsdestotrotz steht die CD95-vermittelte Apoptose in einem Zusammenhang zur Zellzyklusregulation der Zellen, denn ansonsten wäre weder eine Ansammlung in der G0/G1-Phase der überlebenden Zellen, noch eine Anreicherung Caspase-3 positiver Zellen in der G2/M-Phase nachweisbar. Die genaue Verknüpfung von Zellzyklusregulation und Apoptose bleibt jedoch auch nach den Analysen dieser Arbeit ungeklärt. In einer Vielzahl von Publikationen wird inzwischen eine apoptoseunabhängige proliferative Funktion des CD95-Rezeptors und seiner Signalmoleküle (FADD, Caspase-8) postuliert (Zörnig et al. 1998, Zhang et al. 1998, Budd 2002, Salmena et al. 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten in diesem Zusammenhang bedeuten, dass es nach Rezeptorstimulation mit CD95L zwei sich ausschließende Möglichkeiten für die Zellen gibt: Proliferation oder Apoptose. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die proliferative Wirkung unter den gewählten Bedingungen (RKO-Zellen, hCD95L-Stimulation) nicht induziert wird und nur spezifisch für aktivierte T-Zellen (oder einen anderen Liganden) ist.

4.3 Untersuchungen zur apoptoseinhibierenden Wirkung konditionierten RKO-Zellmediums

4.3.1 Die Behandlung mit konditioniertem Medium verlangsamt die Proliferation der RKO-Zellen

Dicht ausgesäte RKO-Zellen stellen aufgrund der erlangten Kontaktinhibition ihr Wachstum ein. Kennzeichen kontaktinhibierter Zellen ist eine erhöhte p27-Expression, welche einen Arrest in der G1-Phase bzw. einen Austritt aus dem Zellzyklus in die G0-Phase zur Folge hat (Blain et al. 2003). Tatsächlich besitzen dicht ausgesäte RKO-Zellen erhöhte p27-Proteinmengen, während die p21-Proteinexpression unbeeinflusst bleibt (Tim Bläsner, AG Zörnig, unveröffentlichte Daten).

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass dichtearretierte RKO-Zellkulturen gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose geschützt sind. Dies könnte in einem direkten Zusammenhang mit dem Zellzyklusarrest bzw. der p27-Expression stehen, dagegen spricht jedoch, dass dünn ausgesäte und damit nicht kontaktinhibierte Zellen, wenn sie mit konditioniertem Medium dicht ausplattierter RKO-Zellen kultiviert werden, ebenfalls gegen den CD95-Apoptosesignalweg protektioniert sind. Diese Zellen zeigen in der Zellzyklusanalyse mit der Propidiumiodidanfärbung eine Zellzyklusverteilung, die der einer unbehandelten dünn ausgesäten proliferierenden Kontrollpopulation entspricht, allerdings mit leicht erhöhtem Anteil von Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase.

Die Analyse der DNA-synthetisierenden (BrdU-inkorporierenden) Zellen ergibt ein deutlicheres Bild. Hier bauen nur 23% der mit konditioniertem Medium behandelten Zellen BrdU ein, im Vergleich zu 54% der unbehandelten proliferierenden Zellpopulation. Nur 10% der kontaktinhibierten Zellen synthetisieren DNA. Die verminderte DNA-Synthese der mit konditioniertem Medium behandelten RKO-Zellen könnte damit begründet werden, dass das konditionierte Medium, das als Überstand konfluenter Zellen entnommen wurde, möglicherweise arm an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ist, und die Zellen demzufolge ähnliche Eigenschaften wie eine in serumreduziertem Medium kultivierte Zellpopulation aufweisen. RKO-Zellen, die in serumfreiem Medium kultiviert werden, zeigen ebenfalls nur eine leicht erhöhte Ansammlung von Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Im Unterschied zu den mit konditioniertem Überstand behandelten RKO-Zellen sind diese Zellen jedoch verstärkt apoptosesensibilisiert, d.h. es sterben in serumreduziertem Medium wesentlich mehr Zellen als in Kompletmedium mit 10% FKS. Mit konditioniertem Medium behandelte RKO-Zellen sind jedoch gegenüber der hCD95L-induzierten Apoptose resistent, was einen Serummangel als Ursache der Protektion ausschließt.

Dicht ausgesäte und in serumfreiem Medium (0% FKS) kultivierte RKO-Zellen produzieren ein konditioniertes Medium, das im Gegensatz zu frischem serumfreiem Medium die CD95-vermittelte

Apoptose vermindert. Hierbei zeigt sich, dass bei höherem Serumgehalt des konditionierten Mediums die protektive Wirkung des Mediums stärker ist. Dies lässt vermuten, dass eine höhere Konzentration an Wachstumsfaktoren im FKS die protektive Wirkung des konditionierten Mediums unterstützt. Dabei verstärkt die Zugabe von FKS zu dem konditionierten Medium nicht die Proliferation der Zellen, denn das hat nur einen geringen Effekt auf den BrdU-Einbau der Zellen (27% vs. 23%). Offensichtlich kann die verminderte Proliferation dieser Population nicht alleine damit begründet werden, dass in konditioniertem Medium ein Nährstoffmangel vorliegt. Die Behandlung mit dem konditioniertem Überstand führt, unabhängig von seinem FKS-Gehalt, zu einer verlangsamen Proliferation der RKO-Zellen.

Die Frage, ob die aus dieser Behandlung resultierende Inhibition der CD95-vermittelten Apoptose demnach von einem G0/G1-Zellzyklusarrest der Zellen abhängig ist, bleibt auch nach diesen Experimenten offen. Einen Hinweis geben allerdings die in Abbildung 3.47 gezeigten Ergebnisse. In diesem Versuch wurden die RKO-Zellen für 2, 4, 6 und 24 Stunden mit dem konditionierten Medium behandelt und für die jeweils letzten 2h mit hCD95L (50 ng/ml) inkubiert. Dabei zeigt sich, dass eine 2-stündige Inkubation der RKO-Zellen mit konditioniertem Medium dicht ausgesäeter Zellen bereits ausreicht, um die hCD95L-induzierte Apoptose zu blockieren. In dieser Zeit ist ein Anhalten der Zellzyklusmaschinerie kaum abgeschlossen, da viele Ereignisse, die zum Zellzyklusarrest führen, auf der Transkription bzw. der Hemmung der Transkription zellzyklusregulierender Moleküle beruhen (E2F, Cyclin D), und natürlich sind in dieser kurzen Zeit die asynchron proliferierenden Zellen noch nicht in der G1-Phase angelangt und arretiert. Zudem ist die anti-apoptotische und proliferationsfördernde Akt-Kinase mit am Protektionseffekt des konditionierten Mediums beteiligt (vgl. 4.3.10). Die Akt-Kinase phosphoryliert und inaktiviert u.a. den CDK-Inhibitor p27, der aber maßgeblich für den Zellzyklusarrest der dichtearretierten RKO-Zellpopulation verantwortlich ist (Vivanco & Sawyers 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass die protektive Wirkung des konditionierten Kulturüberstandes nicht im direkten Zusammenhang mit der verlangsamen Proliferation der mit diesem Überstand behandelten Zellen steht.

Um weiter zu überprüfen, ob die Protektion der CD95-vermittelten Apoptose von einem Arrest der Zellen bzw. einer verlangsamen Proliferation abhängig ist, müsste folgendes Experiment durchgeführt werden: durch experimentelle Manipulationen veränderte RKO-Zellen, die nicht mehr zu arretieren sind (z.B. durch Überexpression proliferativer und Repression anti-proliferativer Gene) müssten mit konditioniertem Medium behandelt werden, um zu untersuchen, ob ein Zellzyklusarrest essentiell für die protektiven Wirkung ist.

4.3.2 Die protektive Wirkung des konditionierten Mediums setzt bereits bei der Caspase-8-Aktivierung ein

Die Behandlung der dünn ausgesäten RKO-Zellen mit dem konditionierten RKO-Medium beeinflusst nicht die Expression des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Dies bedeutet, dass die verminderte Apoptoseinduktion in diesen Zellen durch hCD95L nicht in einer erniedrigten Expression des zugehörigen Rezeptors auf der Oberfläche begründet liegt.

Dicht gewachsene RKO-Zellen besitzen ebenfalls eine der dünn ausgesäten Zellen entsprechenden CD95-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Zusätzlich sind dicht ausgesäte RKO-Zellen trotz der Kontaktinhibition in der Lage, hCD95L-induzierte Signalkomplexe (DISC) zu formieren. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass FADD und Caspase-8 in den rezeptorassoziierten Komplex rekrutiert werden. Dennoch ist eine verminderte Caspase-8-Aktivität sowohl in den dicht ausgesäten, als auch in den dünn ausgesäten und mit konditioniertem Medium dicht ausgesäter RKO-Zellen behandelten Zellen nachweisbar. Dies bedeutet, dass Caspase-8 zwar in den aktivierenden Komplex rekrutiert wird, dort jedoch ihre Aktivität nicht erlangt, d.h. es fehlt die Fähigkeit zur autokatalytischen Aktivierung oder die aktive Caspase-8 wird sofort durch hemmende Moleküle inhibiert. Möglicherweise wird auch die Vernetzung mehrerer DISC-Komplexe miteinander unterbunden (Chang et al. 2003).

Ein bekannter Inhibitor der Caspase-8-Aktivierung im CD95-DISC ist c-FLIP, welches jedoch in dieser Studie in den RKO-Zellen auf Proteinebene nicht nachweisbar ist. Um die Caspase-8-Aktivierung zu hemmen, muss c-FLIP im Verhältnis zu Caspase-8 jedoch überwiegen (Scaffidi et al. 1999). Verschiedene Gruppen konnten nachweisen, dass Proteinkinasen wie PI3K, PKC und PAK4ⁱ auf der Stufe der Caspase-Aktivierung bzw. DISC-Bildung hemmend eingreifen können (Kauffmann-Zeh et al. 1997, Gomez-Angelas & Cidlowski 2001, Gnesutta & Minden 2003). In der T-Zell-Aktivierung, führt die Induktion des MAPK/ERK-Signalweges zur Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose durch Inhibition der Caspase-8-Aktivität im DISC (Holmström et al. 2000).

Weitere Analysen des CD95-Apoptosesignalweges konnten in dieser Arbeit zeigen, dass es neben der niedrigen Caspase-8-Aktivität auch nicht zu den weiteren nachfolgenden Ereignissen nach Caspase-8-Aktivierung kommt: Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials, Cytochrom c-Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung. Dafür ist die (anti-apoptotische) Bcl-x_L-Proteinexpression deutlich erhöht. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass RKO-Zellen aktive Caspase-3 zur vollständigen Caspase-8-Aktivierung benötigen und somit die Inhibierung der Caspase-3-Aktivierung aufgrund der erhöhten Bcl-x_L-Proteinmengen zu einer niedrigen Caspase-8-Aktivität führt (Slee et al.

ⁱ PAK: P21-Activating Kinase

1999). Um zu überprüfen, ob Caspase-8 durch die Caspase-3 aktiviert wird, könnten Zellen mit Bcl-x_L transfiziert, dann mit hCD95L zur Apoptoseinduktion behandelt und schließlich auf Caspase-8-Aktivität hin untersucht werden. Durch eine Erhöhung der Bcl-x_L-Menge würde die Cytochrom c-Freisetzung und damit die Caspase-9/-3-Aktivierung verhindert werden, wodurch wiederum der „Feedback-Loop“ über eine Caspase-8-Spaltung durch Caspase-3 blockiert (und nachweisbar) wäre.

4.3.3 RKO-Zellen produzieren einen anti-apoptotisch wirkenden Überstand

Die in Abschnitt 3.7.1 (Abb. 3.47 A bis D) beschriebenen Experimente demonstrieren, dass dicht ausgesäte RKO-Zellen einen anti-apoptotisch wirkenden Faktor sekretieren, der von dünn ausgesäten Zellen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration produziert wird:

Es wurde eine Verdünnung des Überstandes mit frischem Komplettmedium durchgeführt, was zu einer verminderten Protektion führte. Dies lässt auf eine relativ geringe Konzentration des sekretierten Faktors schließen. Es ist nicht auszuschließen, dass in dem verbrauchten Medium der dichten Zellen ein Bestandteil fehlt, der zur Apoptose benötigt wird. Dieser würde durch das frische Medium wieder zugeführt werden. Dann müsste die Zufuhr von frischem Medium zu den konfluenten RKO-Zellen jedoch ebenfalls eine verminderte Protektion zeigen, was allerdings nicht der Fall ist.

4.3.4 RKO-Zellen sekretieren Zytokine in den Kultur-Überstand

Aufgrund der in dieser Dissertation gezeigten Resultate aus den Zytokinarray-Analysen kann davon ausgegangen werden, dass RKO-Zellen Zytokine sekretieren, die im Überstand dünn ausgesäeter RKO-Zellen in geringerer Konzentration vorliegen als im Überstand dichtearretierter RKO-Zellen. Zu diesen sekretierten Zytokinen gehören IL-8, Angiogenin, IGF-BP2, PlGF und LIF.

IL-8 übt eine angiogenesefördernde Wirkung aus und beeinflusst zudem die Migration von Zellen. Das IL-8 besitzt auch (zumindest in Melanom-Zellen) eine MAPK-vermittelte anti-apoptotische Wirkung (Abdollahi et al. 2003), die sich aber in der vorliegenden Arbeit mit rekombinantem IL-8 in RKO-Zellen nicht bestätigen ließ. IL-8 aktiviert über die Bindung an seinen Rezeptor Proteinkinasen wie PLC und PI3K, aber auch den MAPK-Signalweg (Thelen 2001). Das Zytokin ist zum einen ein Lockstoff z.B. für phagozytierende Zellen, beeinflusst aber auch die Genexpression von Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) und Bcl-x_L (Li et al. 2003). Die Expression des IL-8 selbst wird wiederum über NF-κB reguliert (Karin et al. 2002).

Die Hauptaufgabe des 14kDa schweren Polypeptids Angiogenin, ein Mitglied der RNaseA-Familie, besteht in der Induktion der Neovaskularisierung bzw. Angiogenese. Angiogenin ist normalerweise in geringen Mengen im Plasma vorhanden, wird jedoch im Falle einer Tumorerkrankung deutlich überexprimiert. Erhöhte Plasmawerte werden z.B. bei Kolonkarzinomen (Etoh et al. 2000), Leukämien (AML, Brunner et al. 2002), Zervixkarzinomen (Bodner-Adler et al. 2001) und vielen weiteren Tumorerkrankungen gemessen, was mit einer schlechten Prognose einhergeht. Angiogenin verstärkt das Tumorstadium, die Migrationsfähigkeit sowie die Invasion der Tumorzellen. Es bindet über Heparin an die extrazelluläre Matrix (EZM), aber auch an Aktin, das an Zelloberflächen vorhanden ist. Dieser Angiogenin-Aktin-Komplex dissoziiert und ermöglicht so die Aktivierung des tPA, welches dann Plasmin aus Plasminogen generiert (Hu et al. 1994). Über diesen Mechanismus unterstützt Angiogenin die Invasion von Zellen. Neben der angiogenetischen Wirkung besitzt Angiogenin auch Ribonukleaseaktivität und ist zudem an der Regulation der Genexpression beteiligt, da es in den Nukleus lokalisiert und dort an DNA bindet (Hu et al. 2000).

Die Analyse der migrations- und invasionsfördernden Wirkung von Angiogenin und IL-8 im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab, dass die Zytokine als chemotaktische Lockstoffe die Migration der RKO-Zellen in die Membran der Versuchsanordnung auslösen. Allerdings zeigen Angiogenin und IL-8 nur einen schwachen Effekt auf die Invasion der RKO-Zellen durch die Versuchsmembran. Der Befund, dass eine Proteolyse der beiden Lockstoffe durch Trypsin die Invasion der RKO-Zellen hemmt, deutet darauf hin, dass IL-8 und Angiogenin einen leichten Effekt auf die Invasionsfähigkeit der Zellen haben. Dennoch scheinen diese beiden Zytokine aber nicht alleine für die invasiven Eigenschaften der mit konditioniertem Medium behandelten Zielzellen verantwortlich zu sein, denn das konditionierte Medium induziert einen größeren Anteil von RKO-Zellen zur Invasion als die Kombination von rekombinantem IL-8 und Angiogenin.

Die Untersuchung des konditionierten Kulturüberstandes ergab weiterhin, dass IGF-BP2ⁱ vermehrt in den Überstand der dicht ausgesäten Kultur sekretiert wird. IGF-BP2 interagiert mit IGFⁱⁱⁱ, welches bekanntermaßen sowohl apoptosehemmende als auch proliferative und migrationsfördernde Eigenschaften (über die Aktivierung der PI3K sowie Rho und Rac) besitzt (Friedl & Wolf 2003).

Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass das zugegebene rekombinante IGF in RKO-Zellen keinen anti-apoptotischen Effekt in Bezug auf die CD95-Apoptosesignalkaskade besitzt. Dagegen konnten

ⁱ IGF-BP: IGF-Binding Protein

ⁱⁱⁱ IGF: Insulin-like Growth Factor

Wang et al. zeigen, dass IGF-BP2 zumindest in Glioblastom-Tumorzellen an der Proliferation, Migration und an der Invasion über erhöhte MMP2-Mengen beteiligt ist (Wang et al. 2003).

PlGFⁱ ist ein VEGF-Homolog, welches nach Bindung an seinen Rezeptor (Flt-1) die Signalmoleküle NO und cAMP freisetzt, was zu einer verstärkten Proliferation in malignen Epithelzellen (BeWo-Zellen) führt (Angelucci et al. 2001). Seine Expression kann in Fibroblasten durch Hypoxia induziert werden und wird durch die Anwesenheit von onkogenem Ras noch verstärkt (Green et al. 2001). PlGF hat neben seiner proliferationsfördernden auch eine angiogenetische Wirkung. Des Weiteren stimuliert PlGF über die Aktivierung des PA die Bildung von Plasmin aus Plasminogen (Landgren et al. 1998), was die Invasion von Zellen unterstützt. NO ist ein Signalmolekül, das zum einen in der Angiogenese eine Rolle spielt und zum anderen anti-apoptotische Wirkung besitzt (Dimmeler et al. 1998). Die Zugabe eines synthetischen NO-Donors (SNPⁱⁱ) zu RKO-Zellen in der vorliegenden Studie hatte keine anti-apoptotische Wirkung auf die CD95-vermittelte Apoptosesignalkaskade. Entsprechend konnte die Hemmung der NO-Synthase mit der Substanz L-NAME die Produktion eines protektiv wirkenden Überstandes nicht verhindern. L-NAME verhindert die durch die NO-Synthase katalysierte Generierung von NO aus L-Arginin.

LIFⁱⁱⁱ verstärkt die Proliferation der Enterozyten, während es die Differenzierung derselben hemmt (Kalabis et al. 2003). Proliferation und Differenzierung der Enterozyten müssen genauestens reguliert sein. Eine Überproduktion des proliferationsfördernden LIF bringt das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung durcheinander, was sich auch darin zeigt, dass viele Kolonkarzinomzellen konstitutiv LIF sekretieren (Guimbaud et al. 1998). Neben seiner proliferationsfördernden Wirkung erhöht LIF über eine IL-8-Induktion die Tumorangiogenese und verstärkt Metastasierungsprozesse in Patienten mit Kolitis Ulcerosa (Guimbaud et al. 1998). LIF wird jedoch nicht nur von Kolonkarzinomzellen konstitutiv, sondern wird in der Zellkultur auch von Tumorzellen anderer Organe (u.a. Lunge, Brust, Magen, Leber) sekretiert (Kamohara et al. 1994). LIF wird zudem zur Maus-Stammzellkultur eingesetzt, um die Differenzierung der ES-Zellen zu unterdrücken und die Proliferation zu fördern (Otto & Rao 2004). LIF gehört zur IL-6-Familie und aktiviert den Transkriptionsfaktor Stat3^{iv} (Kritikou et al. 2003, Iwamoto et al. 2004). Nagel-Wolfrum et al. konnten in einer Studie mit Peptid-Aptameren zeigen, dass Stat3 anti-apoptotische Wirkung besitzt,

ⁱ PlGF: Placenta Growth Factor

ⁱⁱ SNP: Sodium Nitroprussid

ⁱⁱⁱ LIF: Leukemia Inhibitory Factor

^{iv} Stat: Signal transducer and activator of transcription

denn die Hemmung mit spezifischen Peptid-Aptameren führt neben Wachstumsstopp zu einer verminderten Bcl-x_L-Proteinexpression sowie Apoptoseinduktion (Nagel-Wolfrum et al. 2004). LIF aktiviert zudem Stat3-abhängig die Sekretion des Überlebensfaktors HGF (Tomida & Saito 2004).

Die Zugabe von IL-6, welches ebenfalls Stat3 aktiviert, hatte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Inhibierung der CD95-vermittelten Apoptose in den RKO-Zellen zur Folge. Allerdings bewirkt eine Hemmung des Jak/Stat-Signalweges mit dem Inhibitor AG490 in diesen Zellen eine Aufhebung der protektiven Wirkung des konditionierten Mediums.

Somit zeigt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal, dass RKO-Zellen folgende Zytokine, welche u.a. an Angiogenese- und Migrationsprozessen beteiligt sind, sekretieren: IL-8, Angiogenin, IGF-BP2, PlGF und LIF. Ein direkter anti-apoptotischer Effekt wurde bereits für IL-8 publiziert (Abdollahi et al. 2003), in der vorliegenden Arbeit konnte aber weder für IL-8, noch für Angiogenin ein direkter Effekt auf die CD95-vermittelte Apoptose nachgewiesen werden. Ein direkter oder indirekter anti-apoptotischer Effekt des IGF, möglicherweise über IGF-BP2, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist ein indirekter Effekt des PlGF auf die hCD95L-induzierte Apoptose über die Freisetzung von NO nicht für die Protektion der CD95-vermittelte Apoptose verantwortlich. Das sekretierte Zytokin LIF aktiviert Stat-3. Während die Zugabe von IL-6 das Apoptoseverhalten der RKO-Zellen nicht beeinflusste, hob die Hemmung des Jak/Stat-Signalweges die protektive Wirkung des konditionierten Mediums wieder auf. Dieser Befund deutet darauf hin, dass der Jak/Stat-Signalweg in den RKO-Zellen IL-6-unabhängig, möglicherweise über LIF, an der Hemmung der hCD95L-induzierten Apoptose beteiligt sein könnte.

4.3.5 Weitere Untersuchungen des sekretierten Faktors

Die Erhitzung des von konfluenten RKO-Zellen konditionierten Mediums für 1 Stunde auf 80°C führt nicht zum Verlust der protektiven Wirkung. Dieser Befund deutet daraufhin, dass es sich um einen hitzestabilen Faktor, möglicherweise ein kleines Peptid, handelt. RNasen zeichnen sich durch ausgeprägte Hitzestabilität aus; Angiogenin allerdings, das RNase-Aktivität aufweist, zeigt in RKO-Zellen keine apoptosehemmende Wirkung (s. voriges Kapitel).

Um die Frage weiter zu untersuchen, ob es sich bei dem protektiv wirkenden und sekretierten Faktor um ein Protein handelt, wurden die dicht ausplattierten RKO-Zellen, von denen das konditionierte Medium geerntet werden soll, mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) inkubiert. Diese Behandlung zeigt aber keinen Effekt auf die protektive Wirkung des Überstandes dieser Kulturen.

Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die gewählten Bedingungen suboptimal waren, da eine Konzentration gewählt wurde, die zwar im Zusammenhang mit hCD95L einen apoptosesteigernden Effekt in RKO-Zellen bewirkt, doch kann es sein, dass die gewählte Konzentration nicht ausreicht, um die Synthese des sekretierten protektiven Faktors zu hemmen. Es wurden keine höheren Konzentrationen benutzt, um einen zytotoxischen Effekt des Cycloheximids auf die RKO-Zellen zu vermeiden, was das Ergebnis hätte verfälschen können.

In einem zweiten Ansatz wurde die Protease Trypsin benutzt, um einen sekretierten Proteinfaktor zu hydrolysieren und damit zu inaktivieren. Die Daten zeigen, dass trotz Inkubation mit Trypsin die protektive Wirkung des Kulturüberstandes bestehen bleibt.

4.3.6 Azidose kann als Ursache der Apoptoseprotektion ausgeschlossen werden

Eine Azidose könnte durch vorherrschenden O_2 -Mangel verursacht werden, woraufhin das durch die Glycolyse bereitgestellte Pyruvat zu Lactat umgesetzt wird, statt im Citrat-Cyclus (TCC) metabolisiert zu werden (anaerobe Glycolyse). Lactat führt zu einer Verminderung des pH-Wertes, was in der Folge die Aktivierung von Hydrolasen induzieren könnte, welche wiederum das hCD95L-Molekül hydrolysieren und damit inaktivieren könnten. Hypoxie kann allerdings aufgrund der Inkubation der Zellen in Gegenwart von O_2 ausgeschlossen werden. Allerdings kann der Mediumsverbrauch über die Produktion katabolitischer Endprodukte zur Azidose führen.

Letztendlich kann eine Azidose als Grundlage der Apoptosehemmung in konditioniertem Medium aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden. Zum einen beeinflusst die Verwendung von HEPES-Puffer (um pH-Wert-Änderungen zu verhindern) die anti-apoptotische Wirkung nicht. Zum anderen hebt die Zufuhr von Glucose zum konditionierten Medium dessen protektive Wirkung nicht auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Ansetzen und Lösen von rekombinantem hCD95L in konditioniertem Medium nicht seine Fähigkeit, Apoptose auszulösen, aufhebt.

4.3.7 Die Behandlung mit konditioniertem Medium führt zu morphologischen Veränderungen der RKO-Zellen

Im Rahmen dieser Studie konnte beobachtet werden, dass RKO-Zellen, die mit dem konditionierten Medium dicht gewachsener RKO-Zellen behandelt wurden, sich abrunden und ablösen. Diese morphologischen Veränderungen führen jedoch nicht zu Einschränkungen ihrer Überlebensfähigkeit: Werden diese abgelösten Zellen neu ausplattiert, wachsen sie an und proliferieren. Zudem zeigte sich eine erhöhte Bcl-x_L Proteinexpression in den abgelösten RKO-Zellen.

Vermutlich bedingt eine Reorganisation des Zytoskeletts die Veränderung der Morphologie der behandelten RKO-Zellen. Zumindest für extrem dicht ausgesäte RKO-Zellen, die sich ebenfalls abrunden und ablösen (Abb. 3.37), konnte eine Deregulierung der Tubulin-Genexpression im Vergleich mit dünn ausgesäten RKO-Zellkulturen festgestellt werden (vgl. 4.3.11).

Interessanterweise konnten Algeciras-Schimmich & Peter (2003) zeigen, dass das Aktin-Zytoskelett in der CD95-vermittelten Apoptose von TypI-Zellen (Caspase-8 aktiviert direkt Caspase-3) eine wesentliche Rolle spielt. Eine Hemmung der Aktin-Polymerisation führte in ihren Studien lediglich in TypI-Zellen zu einer Hemmung der CD95-vermittelten Apoptosekaskade wegen der ausbleibenden Vernetzung („Cluster“-Bildung) der CD95-Komplexe. Varadhachary et al. postulierten 2001 eine Hemmung der CD95-Aggregation bzw. aktinabhängigen lateralen CD95-Diffusion durch die PI3K, was demzufolge die Caspase-8-Spaltung am DISC verhinderte.

In einem Vergleich von TypI- und TypII-Zellen konnten Algeciras-Schimmich et al. (2003) zeigen, dass eine fortgeschrittene Dedifferenzierung charakteristisch für TypI-Zellen ist, während TypII-Zellen differenzierter erscheinen. Charakteristisch für TypI-Zellen ist u.a. die Expression von Integrinen, Kollagenen und angiogenetischen Faktoren. Ein TypI-charakteristisches Molekül ist die PI3K, deren regulatorische Untereinheit (p85) in diesen Zellen überexprimiert wird (Algeciras-Schimmich et al. 2003). Veränderungen während der Karzinogenese sind den Vorgängen während der Embryogenese sehr ähnlich. Die damit einhergehenden Veränderungen der Zellmorphologie, der Verlust des Zell-Zell-Kontaktes sowie die Re-Organisierung des Zytoskeletts, werden als EMTⁱ zusammengefasst, d.h. der Übergang von Epithelzellen (differenziert, TypII) hin zu dedifferenzierten mesenchymalen Zellen (abgelöst, TypI; Algeciras-Schimmich et al. 2003). Die EMT ist ein essentieller Schritt in der invasiven Kaskade, denn Epithelzellen lösen sich als individuelle Einzellzellen aus ihrem Zellverband ab und beginnen sich fibroblastenähnlich zu bewegen. Ein zentrales Molekül dieses Prozesses ist die PI3K. Zytokine binden an Tyrosinkinase-Rezeptoren (z.B. FGF-R1) und aktivieren Ras-abhängig die PI3K, welche daraufhin Rho und Rac aktiviert. Diese GTPasen sind für die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich und induzieren die Migration (Friedl & Wolf 2003).

Der Vergleich dieser Befunde mit den eigenen Daten führt zu der Hypothese, dass sowohl dichtearretierte als auch mit konditioniertem Medium kultivierte RKO-Zellen sich von TypII- zu TypI-Zellen verändern. Unterstützt wird diese These durch den Befund, dass konfluente Zellen ebenfalls EMT-ähnliche morphologische Veränderungen aufweisen, angiogenetische Faktoren in höherer

ⁱ EMT: Epithelial-Mesenchymal-Transition

Konzentration produzieren sowie die PI3K aktivieren. Im Gegensatz zu den von Algeciras-Schimmich et al. publizierten Daten überexprimieren dicht ausgesäte RKO-Zellen nicht die regulatorische p85-Untereinheit der PI3K, sondern die katalytische p110-Untereinheit (vgl. 4.3.11).

Interessant ist dabei auch die Beobachtung, dass konfluente RKO-Zellen trotz der Resistenz gegenüber CD95L sensitiv auf die Behandlung mit anti-CD95-Antikörper mit Apoptose reagieren. Dies könnte bedeuten, dass die zu TypI veränderten Zellen aktinabhängig auf die CD95-vermittelte Apoptose reagieren, aufgrund der Zytoskelettveränderungen aber nicht zur CD95-Vernetzung („Cluster“-Bildung“) in der Lage sind. Der anti-CD95-Antikörper führt jedoch im Gegensatz zum rekombinanten CD95 Liganden zu einem „Clustering“ der Komplexe, und somit wird die Apoptosekaskade effektiv in Gang gesetzt.

4.3.8 Die protektive Wirkung des Zellkulturüberstandes ist tumorzellspezifisch

Endothelzellen benötigen, um lebensfähig zu sein, die Interaktion mit Nachbarzellen bzw. mit der EZM. Ein Kontaktverlust hat die Apoptose der Zellen zur Folge. Dieses Phänomen wird als Anoikis (griechisch für ‚heimatlos‘) bezeichnet. Sterben Zellen nach Ablösung nicht mehr, kann das zur Progression (Metastasierung) einer Tumorerkrankung beitragen. An Anoikis ist eine Vielzahl von Molekülen beteiligt, beispielsweise wird Anoikis durch die Kinase FAKⁱ unterdrückt und durch MEKK-1ⁱⁱ unterstützt (Frisch 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die nicht-transformierten Zelllinien CHOⁱⁱⁱ und NIH 3T3^{iv} nach Erreichen von Konfluenz ablösen und sterben (Anoikis). Abgelöste Zellen dieser Zellkulturen wachsen nach erneutem Ausplattieren nicht wieder an. Dagegen haben Tumorzelllinien wie RKO- und HeLa-Zellen eine Anoikis-Resistenz entwickelt. Die nach Inkubation mit konditioniertem Medium abgelösten Zellen sind lebensfähig, was sie zu gefährlichen potentiell metastasierenden Tumorzellen macht. Weitere Analysen der HeLa-Zellen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass auch diese Zellen einen protektiven Überstand produzieren, d.h. ebenfalls Überlebensfaktoren sekretieren.

ⁱ FAK: Focal Adhesion Kinase

ⁱⁱ MEKK: MEK Kinase

ⁱⁱⁱ CHO: Chinese Hamster Ovarian

^{iv} NIH 3T3: Mausefibroblasten

In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass weder CHO- noch NIH 3T3-Zellen einen apoptosehemmenden Zellkulturüberstand produzieren. Zusätzlich hat das konditionierte Medium konfluenter RKO-Zellen für CHO- und NIH 3T3-Zellen keine vor CD95-vermittelter Apoptose schützende Wirkung; in diesen Zellen wirkt der Überstand sogar apoptoseverstärkend. Dies lässt sich damit erklären, dass in RKO-Zellen ein Überlebensfaktor sekretiert wird, der zwar in RKO-Zellen, nicht aber in nicht-transformierten Zellen einen apoptosehemmenden Signalweg anschaltet. Entweder findet der Faktor keinen entsprechenden Rezeptor (die verantwortlichen Zytokine könnten ausschließlich humane Zellen stimulieren) oder es fehlt ein unterstützendes apoptosehemmendes Signal, welches in den Tumorzellen vorhanden ist. Z.B. sind Mutationen im *PTEN*-Gen in Tumorzellen keine Seltenheit. Dies führt zur verstärkten PI3K-Aktivität, welche proliferative und anti-apoptotische Wirkung besitzt. Möglicherweise ist die PI3K-Aktivierung in NIH 3T3-Zellen u.a. durch das nicht mutierte *PTEN* streng reguliert, so dass es nicht zur Aktivierung kommt. Diese Theorie ließe sich überprüfen, indem die PI3K bzw. ihre aktive Untereinheit in NIH 3T3-Zellen überexprimiert werden würde und daraufhin die apoptosehemmende Wirkung des RKO-Zellkulturüberstandes auf diese Zellen analysiert werden würde.

Tatsächlich wird in vielen Tumorzellen Anoikis über Ras und PI3K/Akt gehemmt (Cheng et al. 2004), und an der Ausführung dieser Apoptoseform sind ebenfalls Todesrezeptorsignalwege beteiligt. So konnten Rytomaa et al. in ihren Analysen zeigen, dass FADD-DN Anoikis in nicht-transformierten Epithelzellen inhibiert und dass Anoikis Liganden-unabhängig über Todesrezeptoren (CD95 oder TRAIL-R1, -R2) ausgelöst wird. Dabei werden Caspase-8 und (über den mitochondrialen Weg) Caspase-3 aktiviert, und Bcl-x_L kann die Caspase-3-Aktivierung hemmen (Rytomaa et al. 1999).

4.3.9 Konditioniertes RKO-Medium protektioniert gegen TRAIL-, UV- und Staurosporin-induzierte Apoptose

Neben dem Einfluss des konditionierten Mediums konfluenter RKO-Zellen auf die hCD95L-induzierte Apoptose wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die TRAIL-, UV- sowie Staurosporin-induzierte Apoptose analysiert. Die durchgeführten Experimente demonstrieren, dass der Überstand der dicht gewachsenen Zellen nicht nur die hCD95L-induzierte Apoptose hemmt, sondern auch TRAIL, UV und Staurosporin inhibiert.

TRAIL bindet an die TRAIL-Rezeptoren R1 und R2, was ebenfalls zur DISC-Bildung mit den Signalmolekülen FADD und Caspase-8 führt und mit der Apoptose der Zelle endet (Ashkenazi 2002). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass derselbe Mechanismus, der dazu führt, dass die Caspase-8-

Aktivierung in der CD95-vermittelten Apoptose inhibiert wird, auch die TRAIL-induzierte Apoptosesignalkaskade hemmt.

Verschiedene Gruppen konnten nachweisen (Aragane et al. 1998, Rehemtulla et al. 1997), dass UV über den CD95-Signalweg (CD95L-unabhängig) Apoptose induzieren kann. Dabei bewirkt die UV-Strahlung das „Clustern“ (Gruppierung, Vernetzung) der Rezeptoren, was zum Auslösen der Apoptosesignalkaskade führt und sowohl durch Caspase-Inhibitoren (zVAD-fmk) als auch durch FADD-DN inhibierbar ist. In konfluenten und mit konditioniertem Medium behandelten RKO-Zellen ist vermutlich aber genau diese Vernetzung gehemmt. Zusätzlich wird in konfluenten und mit konditioniertem Medium behandelte RKO-Zellen Bcl-x_L überexprimiert, was unterstützend zur Blockade der UV-induzierten Apoptose führt. Das „Clustern“ der CD95-Rezeptormoleküle bzw. das Ausbleiben der Vernetzung könnte anhand einer Anfärbung und anschließenden Analyse im konfokalen Mikroskop untersucht werden.

Eine Behandlung mit Staurosporin führt zur Cytochrom c- Freisetzung, zur Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials und damit zur Aktivierung von Caspase-3, was durch einen Caspase-Inhibitor (zVAD-fmk) unterdrückt wird (Giuliano et al. 2004). Obwohl für einige apoptose-induzierende Substanzen eine Beteiligung des CD95-Signalweges (CD95L-unabhängig) gezeigt werden konnte (Micheau et al. 1999), ist die Staurosporin-induzierte Apoptose todesrezeptorunabhängig und durch Bcl-x_L inhibierbar (Nomura et al. 1999). Da in der vorliegenden Arbeit eine Bcl-x_L-Überexpression in konfluenten sowie mit konditioniertem Überstand behandelten RKO-Zellen nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass Bcl-x_L für die Hemmung der Staurosporin-induzierten Apoptose verantwortlich ist.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die hCD95L-induzierte Apoptose in konfluenten bzw. mit konditioniertem Zellkulturüberstand behandelten dünn ausgesäten RKO-Zellen auf der Stufe der Caspase-8-Aktivierung, möglicherweise schon im CD95-DISC, inhibiert wird. Entsprechend werden vermutlich TRAIL- und UV-induzierte Apoptose durch das protektive Medium der konfluenten RKO-Zellen gehemmt. Zusätzlich verhindert die Bcl-x_L-Überexpression den Staurosporin-vermittelten Zelltod. Diese Beobachtungen tragen dazu bei, dass als Ursache der Apoptosehemmung ein CD95-Decoy-Rezeptor (DcR3) bzw. andere inhibierende Effekte, die direkt auf den CD95-Liganden hemmend wirken (z.B. Hydrolasen) ausgeschlossen werden können, denn die Apoptoseprotektion der mit konditioniertem Medium behandelten Zellen erscheint Stimulus-unspezifisch und allgemeinerer Natur.

4.3.10 Rolle der PI3K und PKC für die Apoptoseprotektion und Migration der RKO-Zellen

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl eine Hemmung der PI3K, als auch eine Hemmung der Ca^{2+} -abhängigen PKC-Isoformen die protektive Wirkung des konditionierten Zellkulturüberstandes konfluenter Zellen aufhebt. Dieser Effekt zeigt sich nach Zugabe spezifischer Inhibitoren (Ly294002, Gö6976) zu den dicht ausgesäten RKO-Zellen, von denen das Medium geerntet wurde, jedoch nur schwach bei direkter Zugabe zu dem schon konditionierten Medium auf dünn ausgesäten Zellen für eine entsprechende Inkubationszeit.

Die PI3K ist an vielen Ereignissen beteiligt, die mit dazu beitragen, dass sich ein Tumor (weiter-) entwickeln kann. Die Aktivierung der PI3K führt zur Induktion von Proliferation und Zellvergrößerung sowie zur Hemmung der Apoptose (Vivanco & Sawyers 2002). Diese Ereignisse werden in der Regel Akt-abhängig reguliert. Akt fördert proliferative Prozesse über die Regulierung von Cyclin D, GSK3 β , p27, mTOR und PCNA (Vivanco & Sawyers 2002). Seine apoptosehemmende Wirkung resultiert aus der Beeinflussung der Moleküle Bad, Caspase-9, FKHR, NF- κ B und p53 (Vivanco & Sawyers 2002). Die PI3K kann aber auch Akt-unabhängig wichtige zelluläre Ereignisse steuern. So werden Cdc42 und Rac1 Akt-unabhängig aktiviert, was Veränderungen des Zytoskeletts zur Folge hat (Vivanco & Sawyers 2002). Des Weiteren aktiviert die PI3K die SGKⁱ-Kinase, welche ebenfalls über eine Phosphorylierung von FKHRL1 zum Zellüberleben führt (Brunet et al. 2001). Über noch ungeklärte Wege aktiviert die PI3K zusätzlich die PKC (Vivanco & Sawyers 2002). Über die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac besteht wiederum ein Zusammenhang zu Migrationsprozessen (Ridley et al. 2003).

Die Zugabe des PI3K-Inhibitors zu den produzierenden Zellen vermindert weder die Migration noch die Invasion der mit konditioniertem Medium behandelten RKO-Zellen, obwohl eine Aktivierung des PI3K-Signalweges auch mit verstärkter Migration in Zusammenhang gebracht wird (Price et al. 1999, Friedl & Wolf 2003). Eine verminderte Migration der RKO-Zellen ist lediglich dann nachweisbar, wenn Ly294002-behandeltes konditioniertes Medium zur Anlockung der Zellen in der unteren Kammer des Versuchsaufbaus eingesetzt wird. Dies könnte bedeuten, dass die Sekretion eines Lockstoffes im Gegensatz zur Sekretion eines migrations- bzw. invasionsfördernden Faktors PI3K-abhängig ist. Somit könnte eventuell ein Zusammenhang zwischen Lockstoff und apoptosehemmenden Faktor bestehen, da beide PI3K-abhängig sekretiert werden.

ⁱ SGK: Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase

Interessanterweise hebt Rapamycin, ein Inhibitor des mTOR-Signalweges, nach Zugabe zu den produzierenden Zellen die protektive Wirkung des konditionierten Überstandes ebenfalls wieder auf. mTORⁱ ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche PI3K-abhängig als molekularer Sensor, die Proteinsynthese auf der Basis verfügbarer Nährstoffe reguliert. mTOR kann jedoch auch PI3K-unabhängig als ATP-Sensor aktiviert werden (Vivanco & Sawyers 2002).

Zusammengefasst bedeuten diese Resultate, dass die PI3K zum einen an der Sekretion eines anti-apoptotischen Faktors und zum anderen an der Sekretion eines Lockstoffes beteiligt ist. Es kann durchaus sein, dass es sich dabei um ein und desselben Faktor handelt. Die Hemmung der PI3K in den Zielzellen, d.h. in den Zellen, die mit dem protektiven Medium behandelt werden, kann die Protektion der CD95-vermittelten Apoptose nur geringfügig aufheben. Somit ist die PI3K nicht alleine an der Hemmung der Caspase-8-Aktivierung beteiligt. Möglicherweise resultiert diese Hemmung aus der Aktivierung anderer Kinasen, z.B. der PAK4ⁱⁱ-Kinase (Gnesutta & Minden 2003), der MAPK (Holmström et al. 2000) oder einer Kombination aus aktiver PI3K und PKC. Möglicherweise spielt die Phosphorylierung eines der am DISC beteiligten Signalmoleküle bei der Hemmung der Caspase-8-Aktivierung eine Rolle.

Bemerkenswerterweise besitzen die mit konditioniertem Medium behandelten RKO-Zellen die phosphorylierte und somit aktivierte Form der Akt, wie in der Western Blot-Analyse mit einem Phospho-Akt-spezifischen Antikörper festgestellt wurde. Dies bedeutet entweder, dass die aktivierte Akt nicht alleine für die Apoptosehemmung verantwortlich ist, oder dass es, wenn die anti-apoptotische Akt-Kinase alleine für die Protektion verantwortlich sein sollte, noch einen PI3K-unabhängigen Aktivierungsweg gibt, da nach Hemmung der PI3K in den Zielzellen die protektive Wirkung des konditionierten Mediums nicht aufgehoben wird.

Ähnliche Beobachtungen konnten in dieser Arbeit mit dem PKC-Inhibitor Gö6876 gemacht werden. Die Hemmung der PKC in den konfluenten RKO-Zellen, die das konditionierte Medium produzieren, hebt die Protektion auf, während eine Zugabe des Inhibitors zu den Zielzellen, die mit konditioniertem Medium und hCD95L behandelt werden, einen schwächeren Effekt hat, d.h. die protektive Wirkung wird nur leicht aufgehoben. Es wurde allerdings nicht getestet, ob eine simultane Inhibierung der PI3K und PKC zur Apoptosesensitivität führt. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass ein weiterer Signalweg, z.B. über PAK4 oder MAPK, an der Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose beteiligt ist. Um dies

ⁱ mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

ⁱⁱ PAK: p21-Activating Kinase

herauszufinden, müssten die entsprechenden Signalwege gehemmt werden. Der MAPK-Signalweg kann durch den spezifischen Inhibitor PD98059 gehemmt werden, während für die PAK4 kein spezifischer Inhibitor bekannt ist. Hier bestünde die Möglichkeit, mit siRNA die Expression der Kinase zu hemmen. Der PKC-Inhibitor beeinflusst, nach Zugabe zu den produzierenden Zellen, nicht das invasive Verhalten der mit konditioniertem Medium behandelten RKO-Zellen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Produktion des apoptosehemmenden Faktors PI3K und PKC-abhängig ist, während die Protektion der CD95-vermittelten Apoptose vermutlich von weiteren Faktoren abhängt.

4.3.11 Unterschiedliche Genexpressionsprofile konfluenten und nicht-konfluenten RKO-Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalyse konfluenten und nicht-konfluenten RKO-Zellen (mit und ohne hCD95L-Behandlung) unter Verwendung von *Affymetrix*-Chips (HG-133A) zeigte, dass eine große Anzahl sehr verschiedener Gene unterschiedlich exprimiert wird.

Wie zu erwarten sind in der dicht ausgesäten, kontaktinhibierten Zellpopulation eine ganze Reihe zellzyklusstimulierender Gene herunterreguliert. Beispiele sind die DNA Polymerase E2, Cyclin A, CDC6 und Mitotin, welche alle in den dünn ausgesäten, im Vergleich zu den dicht ausgesäten RKO-Zellen, 3- bis 4-fach höher exprimiert werden.

Interessanterweise ist auch eine Vielzahl von apoptoseregulierenden Genen in sub-konfluenten und konfluenten RKO-Zellen unterschiedlich reguliert:

Die erhöhte Bcl-x_L-Proteinexpression wurde in der vorliegenden Arbeit bereits nachgewiesen. Die Analyse der Genexpression zeigt, dass auch die Bcl-x_L mRNA in dünn ausgesäten, im Vergleich zu dicht ausgesäten Zellen, 3-fach niedriger exprimiert wird.

Das anti-apoptotische c-IAP2 wird im Vergleich zu den konfluenten Zellen in den dünn ausgesäten RKO-Zellen 4-mal schwächer exprimiert. Wird hCD95L zur Apoptoseinduktion zugegeben, liegt c-IAP2 in der sub-konfluenten sogar 17-mal schwächer exprimiert vor als in der dichten Zellpopulation. IAPs hemmen über ihre BIR-Domänen durch direkte Interaktion Caspase-3 und Caspase-9 (Salvesen & Duckett 2002). XIAP hat zwar in einer sehr hohen Konzentration auch Caspase-8-inhibierende Wirkung, für c-IAP2 wurde ein solcher Effekt jedoch noch nicht beschrieben (Salvesen & Duckett 2002). Die hCD95L-Stimulation der RKO-Zellen hat in den dünn ausgesäten, jedoch nicht in den konfluenten Zellen, die Repression der c-IAP2-Transkription (oder der RNA-Stabilität) zur Folge.

Wenn die Apoptoseprotektion bereits auf der Ebene der Caspase-8-Aktivierung auftritt, ist c-IAP2 nicht ursächlich daran beteiligt. Vielleicht inhibiert c-IAP2 jedoch so wie das stärker exprimierte Bcl-x_L die Cytochrom c-Freisetzung und unterbindet somit eine „Feedback“-Aktivierung der Caspase-8 über Caspase-3.

HMGB1ⁱ, welches kürzlich als Apoptoseinhibitor des mitochondrialen Weges publiziert wurde (Brezniceanu et al. 2003), wird in der nicht-konfluenten Zellpopulation, unabhängig von der hCD95L-Stimulation, in beiden Vergleichen 3-fach schwächer exprimiert. Da HMGB1 erst auf der mitochondrialen Ebene protektiv eingreift, könnte es ähnlich wie Bcl-x_L und c-IAP2 die „Feedback“-Aktivierung von Caspase-8 über Caspase-3 unterbrechen.

GADD45Aⁱⁱ wird in der dünn ausgesäten Zellpopulation um das 10-fache schwächer exprimiert. Dieses durch p53 regulierte Gen wird durch Zellzyklusarrest und DNA-Schädigung induziert. Zhang et al. konnten nachweisen, dass sich dichtearretierte Zellen nicht nur durch erhöhte p27-Mengen, sondern auch durch eine verstärkte GADD45A-Expression auszeichnen (Zhang et al. 2003). Jin et al. beobachteten in ihren Experimenten, dass erhöhte GADD45A-Expression, über einen MAPK-abhängigen Signalweg, vor UV-induzierter Apoptose schützt (Jin et al. 2003). Eventuell ist GADD45A auch in RKO-Zellen an der untersuchten Apoptoseprotektion (MAPK-vermittelt) beteiligt.

CD30 (TNF-R 8), ein weiteres Familienmitglied der TNF-Rezeptorfamilie, wird ebenfalls nach hCD95L-Behandlung in der sub-konfluenten im Vergleich zur konfluenten Zellpopulation 3-fach niedriger exprimiert. CD30 ist ein für aktivierte T- und B-Zellen charakteristischer Oberflächenrezeptor, welcher nach Aktivierung die TRAF-Moleküle TRAF2 und TRAF5 rekrutiert, was zur Aktivierung von NF-κB und MAPK führen kann. Die CD30-vermittelte Signalkaskade kann je nach Zelltyp und ko-stimulatorischen Signalen zu Proliferation und Überleben, aber auch zu Zellzyklusarrest und Apoptose führen (Schneider & Hubinger 2002).

Zusätzlich wird auch TNF-R 10c (TRAIL-R3/TRID) in den hCD95L-behandelten, sub-konfluenten im Vergleich zu den konfluenten Zellen um das 3-fache erniedrigt exprimiert. Es handelt sich hierbei um einen 'TRAIL-,Decoy'-Rezeptor, der aufgrund einer fehlenden intrazellulären Domäne das TRAIL-Liganden-Apoptosesignal nicht weiter vermitteln kann. Daher könnte die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche konfluenten Zellen mit zur Protektion der TRAIL-induzierten Apoptose beitragen,

ⁱ HMGB1: High-Mobility Group Box-1

ⁱⁱ GADD45A: Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene

ist aber an der Inhibierung der durch andere Apoptose-Stimuli (CD95L, UV, Staurosporin) ausgelösten Apoptose vermutlich nicht beteiligt.

Wie bereits erwähnt, spielt die PI3K in der Apoptoseprotektion der RKO-Zellen eine bedeutende Rolle. Unterstützt werden die vorangegangenen Beobachtungen dadurch, dass die katalytische Untereinheit p110 der PI3K, unabhängig einer hCD95L-Behandlung, 3-fach geringer in subkonfluenten, proliferierenden als in konfluenten, dichtearretierten Zellen exprimiert wird.

Die MAPKⁱ-Familienmitglieder MEK5b und MEK5c werden nach einer hCD95L-Inkubation in der dünn ausgesäten Zellpopulation um das 9- bzw. 10-fache niedriger exprimiert. MEK5 aktiviert ERK5 (BMK1ⁱⁱ) und wird selbst von MEKK2/3 aktiviert. Pi et al. postulieren, dass BMK1 über die Phosphorylierung und damit Inaktivierung des pro-apoptotischen Bad-Moleküls Endothelzellen vor Apoptose schützt (Pi et al. 2004). In wieweit MEK5b und MEK5c in der Apoptoseregulation der RKO-Zellen beteiligt sind, ist noch unklar.

PKC ϵ , ein Familienmitglied der atypischen PKC-Familie, wird nach hCD95L-Behandlung in nichtkonfluenten Zellen 3-fach niedriger exprimiert als in konfluenten Zellen. Atypische PKC-Isoformen benötigen lediglich Phosphatidylserin, um aktiv zu werden (Gutcher et al. 2003). PKC ϵ ist zum einen an der „Bcr-Abl“-vermittelten Resistenz gegenüber substanzinduzierter Apoptose beteiligt. Zum anderen unterstützt PKC ϵ auch Apoptose- bzw. Anoikisresistenz in Abwesenheit von EZM-Kontakte durch eine erhöhte Phosphorylierung und damit Stabilisierung von p53 (Gutcher et al. 2003). Möglicherweise ist die PKC ϵ an der Apoptoseresistenz der dicht ausgesäten und der mit konditioniertem Medium von konfluenten Zellen behandelten RKO-Zellen beteiligt. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete PKC-Inhibitor (Gö6976) hemmt spezifisch die Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoformen, jedoch nicht die atypischen PKCs. Um die Beteiligung von PKC ϵ an der Apoptoseprotektion in RKO-Zellen zu überprüfen, müsste ein spezifischer Inhibitor der atypischen PKC-Isoformen eingesetzt werden.

Der Transkriptionsfaktor ATF3ⁱⁱⁱ ist an der transkriptionellen Regulierung des *ASNS*-Gens in Antwort auf einen Nährstoffmangel beteiligt. Zudem spielt er in der Protektion vor Apoptose eine Rolle, die durch ionisierende Strahlung, Doxorubicin sowie TNF α -induziert wird. ATF3 wird entweder direkt durch p53 aktiviert, kann aber auch über den MAPK-Signalweg aktiviert werden (Pan et al. 2003, Kool

ⁱ MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

ⁱⁱ BMK: Big Mitogen-activated protein Kinase

ⁱⁱⁱ ATF: Activating Transcription Factor

et al. 2003, Zhang et al. 2002). ATF3 wird, unabhängig von einer hCD95L-Behandlung der Zellen in beiden Vergleichen in dünn ausgesäten RKO-Zellen um das 3-fache erniedrigt exprimiert. ATF3 könnte also auch an der Apoptoseprotektion in RKO-Zellen beteiligt sein.

Die Asparagin-Synthetase (ASNS) spielt eine Rolle in der G1-Zellzyklusphase. Ihre nährstoffregulierte Expression wird in Antwort auf einen Aminosäuremangel hochreguliert (Bruhat et al. 2002). Das ASNS-Gen wird in nicht-konfluenten RKO-Zellen um das 7-fache erniedrigt und nach einer hCD95L-Behandlung sogar um das 15-fache niedriger exprimiert als in der dichtearretierten Zellpopulation. Dies bedeutet, dass in dicht ausgesäten RKO-Zellen ein Aminosäuremangel vorherrscht und die induzierte ASNS womöglich der Auslöser für die Umwandlung vom apoptosesensitiven hin zum apoptoseresistenten RKO-Typ sein könnte.

Bemerkenswerterweise sind auch eine Vielzahl Angiogenese-, Migration- und Zytoskelett-beeinflussender Gene unterschiedlich reguliert:

CD24 ist ein GPI-verankertes Zelloberflächenglycoprotein, das u.a. auf Neutrophilen und vielen Tumorzellen exprimiert wird. CD24 vermittelt das „rolling“ von Tumorzellen, indem es mit P-Selectin interagiert. Diese Interaktion ist ein wichtiger Adhäsionsmechanismus bei der Tumorzellinvasion (Aigner et al. 1998). CD24 kann als Marker für einen metastasierenden Phänotyp angesehen werden (Fogel et al. 1999). Im Vergleich zur Expression in den dicht ausgesäten RKO-Zellen wird CD24 in den dünn ausgesäten 5-mal weniger exprimiert.

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) erleichtern die Metastasierung, indem sie Barrieren der extrazellulären Matrix (EZM) proteolytisch abbauen. MMP17 ist über einen GPI-Anker an die Plasmamembran gebunden und aktiviert hier durch Spaltung pro-MMPs, wie z.B. MMP-2 (Egeblad & Werb 2002). Nach einer Behandlung mit hCD95L wird MMP17 in den dünn ausgesäten 6-mal weniger exprimiert als in den dicht gewachsenen RKO-Zellen. Die Behandlung der produzierenden RKO-Zellen mit einem MMP-Inhibitor (hemmt in der eingesetzten Konzentration u.a. MMP-7,-9,-3,-1) beeinflusste z.T. die protektive Wirkung des Zellkulturüberstandes. Das heißt, dass MMPs möglicherweise an der Sekretion des anti-apoptotischen Faktors beteiligt sind, aber wohl auch alternative Wege zur Abspaltung eines Faktors, z.B. über uPA bestehen. Die optimale Konzentration des Inhibitors müsste weiter ausgetriggert werden, um eine Aufhebung der Sekretion des „Survival“-Faktors zu erreichen. Viele sekretierte Zytokine (Wachstumsfaktoren und „Survival“-Faktoren), liegen

zunächst membrangebunden vor und werden erst durch Proteasen (MMPs, uPA, ADAM) abgespalten. IL-8 wird z.B. durch MMP-9 freigesetzt (Egeblad & Werb 2002).

uPAⁱ wird nach einer hCD95L-Behandlung in dünn ausgesäten Zellen im Vergleich zu den dicht ausgesäten Zellen um das 8-fache erniedrigt exprimiert. uPA aktiviert Plasminogen zu Plasmin, welches über den hydrolytischen Abbau von Basalmembran und EZM die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen erleichtert (Chandrasekar et al. 2003). uPA aktiviert über den uPA-Rezeptor den PI3K-Akt Signalweg, welcher zu Tumorzellproliferation, -migration und Apoptoseinhibierung führt (Chandrasekar et al. 2003). Kaneko et al. konnten nachweisen, dass die Expression von uPA mit der Angiogenese und Invasion von Tumorzellen des Magen-Darm-Trakts korreliert (Kaneko et al. 2003). Han et al. zeigten, dass der MAPK-Signalweg an der uPA-Aktivierung bzw. mRNA-Stabilisierung beteiligt ist (Han 2002). Entsprechend wird tPAⁱⁱ, unabhängig einer hCD95L-Behandlung, in sub-konfluenten Zellen im Vergleich zu konfluenten Zellen um das 4-5-fache niedriger exprimiert. Somit könnte uPA und/oder tPA in der Abspaltung des „Survival“-Faktors eine Rolle spielen.

ADAMTS2, ein Mitglied der ADAMⁱⁱⁱ-Familie, welches ebenfalls an proteolytischen Ereignissen an der Zelloberfläche beteiligt ist (Freisetzung von membrangebundenen Faktoren), wird nach Behandlung mit hCD95L in den dünn ausgesäten Zellen 9-mal schwächer exprimiert als in den dicht ausgesäten Zellen und ist womöglich ebenso an der Freisetzung von Zytokinen beteiligt.

Rho und RhoG (Rac) werden jeweils um das 4-fache schwächer in der sub-konfluenten als in der konfluenten Zellpopulation exprimiert. Auf die Bedeutung von Rho und Rac für die Migration (Ridley et al. 2003) wurde bereits ausführlich hingewiesen.

Nach einer Behandlung mit hCD95L wird die Genexpression der Zytokine LIF und Angiogenin in der dünn ausgesäten Zellkultur jeweils um das 8-fache reduziert. Dies bestätigt die mit den Zytokin-Arrays erhaltenen Resultate, denn dort konnte die Sekretion von LIF und Angiogenin in den Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

Das IGF-BP5^{iv} wird nach hCD95L-Behandlung 3-mal schwächer in dünn ausgesäten RKO-Zellen exprimiert als in dicht ausgesäten; allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass

ⁱ uPA: urokinase-type Plasminogen Activator

ⁱⁱ tPA: tissue-type Plasminogen Activator

ⁱⁱⁱ ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase

^{iv} IGF-BP5: IGF-Binding Protein 5

rekombinantes IGF in RKO-Zellen (in der verwendeten Konzentration) keinen apoptosehemmenden Effekt zeigt.

Die Expression des HGFⁱ-Rezeptor Met ist nach Behandlung mit hCD95L in nicht-konfluenten Zellen dreimal so niedrig wie in konfluenten RKO-Zellen. Met erhöht die Motilität und Invasion von Zellen über die Bindung seines Liganden HGF (Bernards 2003). Zusätzlich hemmt Met die CD95-vermittelte Apoptose, indem Met den CD95-Rezeptor bindet und somit die Bildung von CD95-Aggregaten verhindert (Wang et al. 2002). In der Zytokinarray-Analyse konnte keine Sekretion des HGF in das konditionierte Medium dicht ausgesäter RKO-Zellen nachgewiesen werden. Wenn Met jedoch auch Liganden-unabhängig mit dem CD95-Rezeptor interagiert, kann dies zur Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose zumindest in konfluenten RKO-Zellen beitragen. Hierzu sind allerdings keine Daten publiziert.

EGF wird nach hCD95L-Inkubation in den dünn ausgesäten Zellen um das 4-fache erniedrigt exprimiert. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Inkubation der RKO-Zellen mit EGF nicht die CD95-vermittelte Apoptose hemmt. Somit ist EGF nicht ursächlich für die protektive Wirkung des konditionierten Mediums verantwortlich.

Es ist auffallend, dass nicht-konfluente Zellen eine 4-fach höhere Expression einiger Tubuline besitzen. Dies könnte ein Hinweis auf EMTⁱⁱ-bedingte Veränderungen in der Zytoskelett-Zusammensetzung sein, d.h. eine Umwandlung einer epithelverankerten Zelle (dünn ausgesät) hin zur migrierenden Einzelzelle (dicht ausgesät, abgerundet und abgelöst). Zusätzlich wird das aktinregulierende Gelsolin, welches die Auflösung des Aktinnetzes fördert, in dünn ausgesäten, nicht mit hCD95L-behandelten Zellen 3-fach niedriger exprimiert. Gelsolin wird im Verlaufe der Apoptose von Caspase-3 gespalten. Es ist aber auch in der Lage, in seiner ungespaltenen Form die Apoptose zu hemmen, indem es über noch ungeklärte Mechanismen die Depolarisierung der mitochondrialen Membran sowie die Cytochrom c - Freisetzung aus den Mitochondrien verhindert (Koya et al. 2000).

Zur Absicherung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der unterschiedlich konfluenten RKO-Zellen müsste die veränderte Expression auch auf RNA- sowie Protein-Ebene bestätigt werden, beispielsweise durch „Real-Time“-PCR und Western Blot-Analyse.

ⁱ HGF: Hepatocyte Growth Factor (Scatter Factor)

ⁱⁱ EMT: Epithelial-Mesenchymal-Transition

4.3.12 Schlussfolgerung:

Konfluente und auch mit konditioniertem Medium behandelte RKO-Zellen zeigen morphologische und andere Veränderungen im Vergleich zu dünn ausgesäten RKO-Zellen, die den Veränderungen der EMT sehr ähnlich sind. Es kommt zu Veränderungen der Zytoskelett-Zusammensetzung (Tubuline, Gelsolin), die Zellen verlieren den Zell-Zell-Kontakt und lösen sich ab, bleiben aber am Leben. Zusätzlich zeichnen sich dicht gewachsene Zellkulturen durch die Sekretion von Zytokinen aus, die Angiogenese, Migration und Invasion positiv beeinflussen. Konfluente, als auch mit konditioniertem Medium behandelte sub-konfluente Zellen sind apoptoseresistent (hCD95L, TRAIL, UV, Staurosporin). Daran sind mindestens die Kinasen PKC und PI3K, möglicherweise auch die MAPK, beteiligt. Die Zellen sterben jedoch bei Behandlung mit dem anti-CD95-Antikörper (anders als bei Verwendung des rekombinanten Liganden), was bedeuten könnte, dass eine mangelhafte Vernetzung der einzelnen DISC-Komplexe zur Apoptosehemmung führt, welche durch den Antikörper aber erzwungen wird. Beispielsweise induziert das Ras-Protein Angiogenese und Zellmigration über einen PI3K-abhängigen, aber auch über einen MAPK-abhängigen Signalweg. Möglicherweise sind an den Angiogenese- und Migrationsprozessen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ebenfalls zwei bzw. mehrer Signalwege beteiligt, die einander ersetzen können, wenn einer davon blockiert wird. Zwar handelt es sich hierbei um ein reines Zellkulturmodell, dennoch könnte es bedeuten, dass die Zellumgebung vergleichbar ist mit der in größeren soliden Tumoren. Die Zellen brauchen Nährstoffe (Aminosäuremangel: Hochregulation von ASNS, ATF3), versuchen über eine Neovaskularisierung (Ephrin-A, Angiogenin, IL-8, PlGF) Anschluss an ein Blutsystem zu finden, sekretieren Lockstoffe (IL-8, Angiogenin, LIF), Wachstumsfaktoren (EGF?) sowie Proteasen (uPA, tPA, MMP), um Zellen anzulocken und die Basalmembran durchbrechen zu können, was letztendlich die Metastasierung erleichtern soll. Über Oberflächenrezeptoren wie Met und CD24 wird das Andocken und Wandern vermittelt.

PI3K, cPKCs (plus PKC α) und evtl. MEK5, aber auch Bcl-x $_L$, c-IAP2 und evtl. GADD45A tragen dabei zu einer Apoptoseresistenz bei, welche die Zellen zum einen resistenter gegenüber Anoikis, Nährstoffmangel, aber auch gegen angreifende zytotoxische T-Zellen werden lässt. Eine weitere Aufklärung der hier ablaufenden Prozesse würde es erleichtern, Möglichkeiten zu finden, in diese Signalwege einzugreifen, um die Apoptosesensitivität wieder herzustellen und die Metastasierung zu verhindern. Dabei müsste z.B. geklärt werden, welche transkriptionellen Ereignisse zur Expression der apoptosehemmenden und der migrationsfördernden Gene verantwortlich sind (NF- κ B, p53, MAPK?). Zwar fällt NF- κ B in konfluenten Zellen nicht durch eine veränderte Genexpression auf, aber Bcl-x $_L$ und IAP sind beispielsweise NF- κ B Zielgene. Zudem wird NF- κ B durch Komplexbildung mit I κ B post-

translational inaktiv gehalten. Akt wiederum kann die IKK-Kinase phosphorylieren und damit aktivieren, was zur Degradierung des inhibitorischen I κ Bs führt. NF- κ B wird dann frei und wandert aus dem Zytoplasma in den Nukleus, um dort Zielgene zu aktivieren (Vivanco & Sawyers 2002). Das bedeutet, dass NF- κ B auch anders als durch transkriptionelle Hochregulation aktiviert werden kann.

In Abbildung 4.1 ist hypothetisch die Umwandlung des „Epithel-Zelltyps“ (dünn ausgesät, TypII-Zellen) zum migrierenden mesenchymalen Typ (abgerundete, abgelöste Zellen, TypI) mit dem einhergehenden Verlust der Apoptosesensitivität dargestellt.

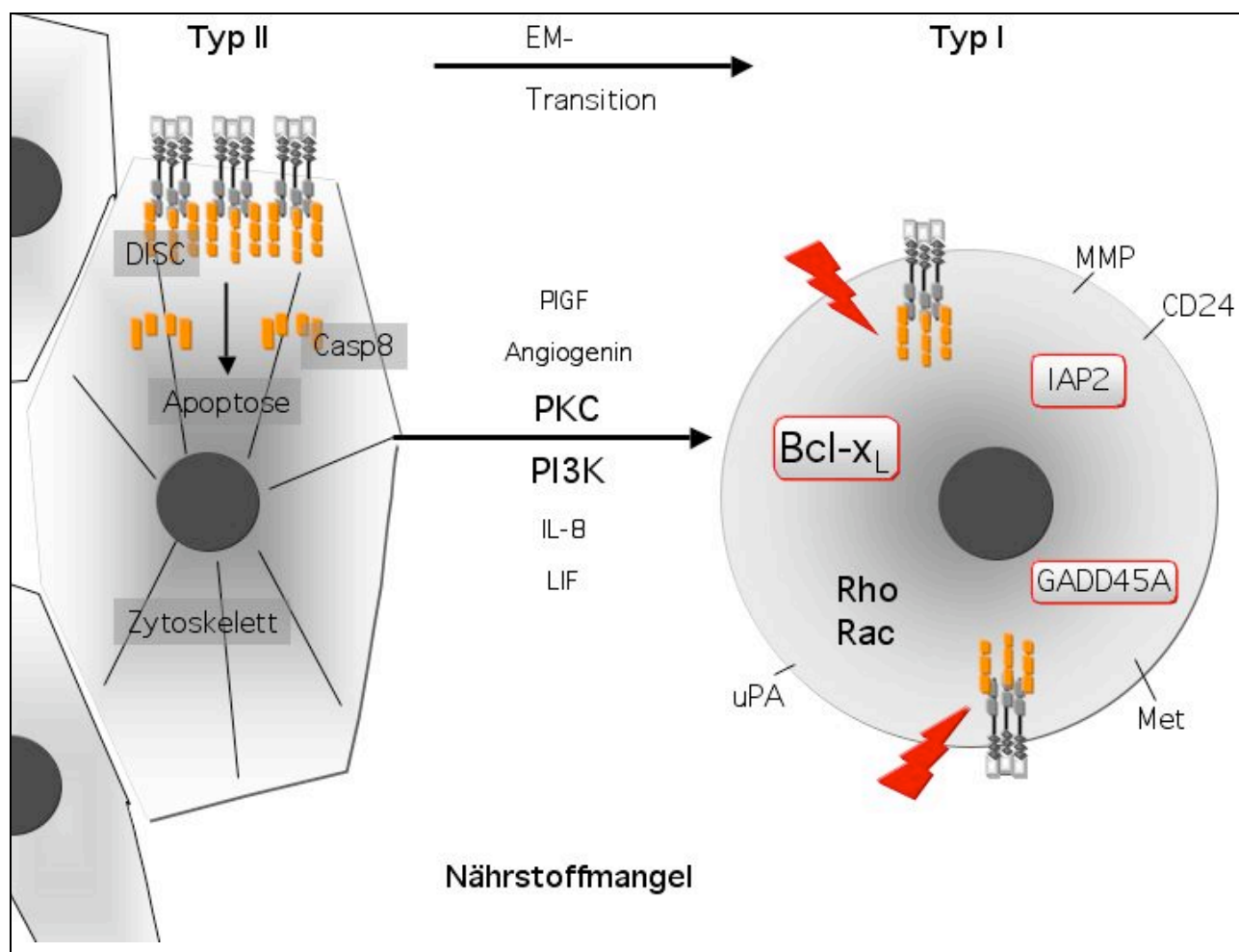


Abb. 4.1 Modell der in RKO-Zellen stattfindenden Veränderungen bei konfluentem Wachstum bzw. bei Behandlung mit konditioniertem RKO-Medium

Möglicherweise ausgelöst durch einen Nährstoffmangel kommt es zu morphologischen Veränderungen (Zytoskelett, Rho-GTPasen), die zur Abrundung, Ablösung aus dem Zellverband und damit zur Umwandlung in eine migrierende und invasive Einzellzelle (EM-Transition) führt. Dabei werden Zytokine wie Angiogenin, IL-8, LIF und PIGF sekretiert und Signalwege über die PI3K und PKC aktiviert, die zur Apoptosehemmung führen, indem eine Vernetzung der DISC-Komplexe verhindert, aber auch Bcl-x_L überexprimiert wird. Zusätzlich spielen c-IAP2 und GADD45A, sowie MMPs, CD24, Met, uPA und evtl. MAPK eine Rolle. Diese Gene werden alle in konfluenten Zellen unterschiedlich exprimiert im Vergleich zu dünn ausgesäten, exponentiell wachsenden RKO-Zellen.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Zellzyklusabhängigkeit der CD95-vermittelten Apoptose besteht. Dazu wurde ein ecdysoninduzierbares Genexpressionsystem für die induzierte Überexpression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 in RKO-Zellen (Kolonkarzinomzellen) zur Herbeiführung eines Zellzyklusarrests in der G1-Phase benutzt. Nach Induktion mit dem Ecdyson-homolog Muristeron wurde durch Zugabe von rekombinanten hCD95-Liganden Apoptose ausgelöst und anschließend untersucht. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der Induktor Muristeron an sich und nicht die p21- bzw. p27-Überexpression die anti-apoptotische Akt-Kinase aktiviert, die Expression des anti-apoptotischen Bcl-x_L erhöht, die Caspase-8-Aktivierung (entweder am CD95-DISC oder durch „Feedback“-Aktivierung durch Caspase-3) und die darauf folgenden Ereignisse verhindert und somit die hCD95L-induzierte Apoptose blockiert. Zusätzlich beeinflusst der Induktor auch das Genexpressionsmuster der behandelten Zellen, was ebenfalls für die Hemmung der Apoptose mit verantwortlich sein könnte. Somit ist das ecdysoninduzierbare Genexpressionsystem zur Apoptoseuntersuchung in RKO-Zellen nicht verwendbar.

Mit der Untersuchung des Apoptoseverhaltens proliferierender RKO-Zellen konnte gezeigt werden, dass überlebende Zellen nach hCD95L-Behandlung vermehrt in der G0/G1-Zellzyklusphase nachweisbar sind, während apoptotische (Caspase-3-positive) Zellen aus der G2/M-Phase heraus sterben. Allerdings weisen die apoptotischen Zellen kaum Cyclin B1 auf, ein für die G2-Phase wichtiges und typisches Cyclin. Somit bleibt die genaue Verknüpfung von Zellzyklusregulation und Apoptose auch nach diesen Analysen ungeklärt.

In einem dritten Ansatz - Zellzyklusarrest durch Dichtearretierung - konnte eine Hemmung der CD95-vermittelten Apoptose in der arretierten Zellpopulation nachgewiesen werden. Allerdings sekretieren RKO-Zellen einen anti-apoptotischen Faktor in ihr Medium, dessen Konzentration und Wirkung mit größerer Zelldichte zunimmt und somit für die Protektion, unabhängig von Zellzyklusarrest oder Proliferation, verantwortlich ist.

Konfluente und auch mit konditioniertem Medium behandelte RKO-Zellen zeigen im Vergleich zu dünn ausgesäten RKO-Zellen Veränderungen, die denen sehr ähnlich sind die beim Übergang einer epithelverankerten Zelle zu einer migrierenden Einzelzelle (EMT) auftreten. Beispielsweise verändert

sich die Zusammensetzung des Zytoskeletts, die Zellen verlieren den Zell-Zell-Kontakt und lösen sich ab, bleiben aber am Leben. Zusätzlich steigt die Sekretion von Zytokinen an, die Angiogenese, Migration und Invasion positiv beeinflussen. Sowohl konfluente als auch mit konditioniertem Medium behandelte sub-konfluente Zellen sind apoptoseresistent (hCD95L, TRAIL, UV, Staurosporin), woran u.a. die Kinasen PKC und PI3K, aber auch das anti-apoptotische Bcl-x_L beteiligt sind. Die Zellen sterben interessanterweise, wenn ein agonistischer anti-CD95-Antikörper statt des rekombinanten CD95-Liganden verwendet wird, was vermuten lässt, dass eine mangelhafte Vernetzung der einzelnen DISC-Komplexe zur Apoptosehemmung führt, welche durch den Antikörper dann aber erzwungen wird. Zwar handelt es sich hierbei um ein reines Zellkulturmodell, dennoch könnte es bedeuten, dass die Umgebung in einer dichten RKO-Zellkultur vergleichbar ist mit der in größeren soliden Tumoren. Die Zellen brauchen Nährstoffe, versuchen über eine Neovaskularisierung Anschluss an ein Blutssystem zu finden und sekretieren Lockstoffe, Wachstumsfaktoren sowie Proteasen, um die Metastasierung zu erleichtern. PI3K, cPKCs und Bcl-x_L tragen dabei zu einer Apoptoseresistenz bei, welche die Zellen zum einen resistent gegenüber Anoikis, Nährstoffmangel, aber auch gegen angreifende zytotoxische T-Zellen macht. Eine weitere Aufklärung der hier ablaufenden Prozesse würde es erleichtern, Möglichkeiten zu finden, in diese Signalwege einzugreifen, um die Apoptosesensitivität wieder herzustellen und die Metastasierung zu verhindern. Insbesondere ist die Identifizierung des für die Apoptoseprotektion verantwortlichen Zytokins das nächste wichtige Ziel bei der Fortsetzung dieser Arbeiten.

5.2 Summary

The aim of this study was to investigate whether a cell cycle dependency in CD95 mediated apoptosis exists. Therefore an ecdysone-inducible expression system was used to induce overexpression of the CDK-inhibitors p21 and p27 in RKO cells (colon carcinoma cell line) to arrest them in the G1 cell cycle phase. Upon transgene induction with the ecdysone homologue muristerone, apoptosis was induced via addition of recombinant hCD95 ligand and then further analyzed. The results demonstrate that muristerone itself and not the overexpression of p21 or p27 activates the anti-apoptotic Akt kinase, increases expression levels of anti-apoptotic Bcl-x_L, inhibits caspase-8 activation (possibly at the CD95 DISC or alternatively at the level of feedback activation by caspase-3) as well as downstream events, and therefore inhibits hCD95L-induced apoptosis. Additionally the inductor influences the gene expression profile of treated cells, which could also be involved in the inhibition of apoptosis. In conclusion, these data show that the Ecdysone-inducible gene expression system is not useful to study apoptosis in RKO cells.

By investigating apoptotic behavior of proliferating RKO cells the observation was made that, upon hCD95L treatment, surviving cells are more likely to be found in the G0/G1-cell cycle phase. Apoptotic (caspase-3 positive) cells preferentially die from G2/M-phase as judged by the DNA profile, although they do not express the G2/M-typical cyclin B. Therefore, the question of a direct link between cell cycle and apoptosis still remains open.

In a third approach - cell cycle arrest via contact inhibition of dense cells - an inhibition of CD95-mediated apoptosis in cell cycle arrested cells could be proven. Further analysis revealed that RKO cells secrete an anti-apoptotic factor into the medium, with increasing concentration (and effectiveness) with higher cell density. This factor is responsible for apoptosis protection, independently of cell cycle arrest or proliferation. Dense RKO cells and cells plated at low density before treatment with conditioned medium show changes similar to those in epithelial-mesenchymal transition (EMT) if compared to sparsely seeded RKO cells: cytoskeleton reorganization, loss of cell-cell-contact, loss of adherence and anoikis resistance. In addition, secretion of angiogenesis-, migration- and invasion-inducing cytokines increases. Dense, as well as sparse cells treated with conditioned medium are apoptosis-resistant (hCD95L, TRAIL, UV, staurosporine). The kinases PKC and PI3K and the anti-apoptotic Bcl-x_L contribute to the resistance phenotype. The cells die however if treated with anti-CD95-antibody, suggesting an insufficient clustering of single DISC-complexes and inhibition of apoptosis when the cells are treated with recombinant hCD95 ligand. The agonistic CD95-antibody on the other hand forces DISC clustering. This cell culture model may be comparable to the situation in large solid tumors. The cells need nutrients, try to connect to the vascular system through angiogenesis and secrete chemoattractants, growth factors and proteases to facilitate metastasis formation. PI3K, cPKC and Bcl-x_L induce apoptosis resistance, which protects cells against anoikis, serum deprivation and cytotoxic T cells. Further investigations of underlying mechanisms could provide new targets to manipulate the signaling pathways in order to restore apoptosis sensitivity in tumor cells and to prevent metastasis formation. In this context, it will be highly interesting to identify the anti-apoptotic factor secreted by RKO cells.

6 Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
abgl.	abgelöst
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADP	Adenosin 5`-diphosphat
AICD	Activation Induced Cell Death
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AK	Antikörper
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
Apaf	Apoptotic protease activating factor-1
ASNS	Asparagin-Synthetase
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosin 5`-triphosphat
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
BH	Bcl-2 Homology domain
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BMK	Big Mitogen activated Kinase
bp	Basenpaar
BrdU	Bromodeoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
Ca.	Circa
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domain
CD95L	CD95 Ligand
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKI	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CED	Cell death abnormal
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CHX	Cycloheximid
Cyt c	Cytochrome c
d	Tag
dATP	2`-Desoxyadenosin-5`triphosphat
DAG	1,2-Diacylglycerol
dCTP	2`-Desoxycytidin-5`triphosphat
DcR3	Decoy receptor 3
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
dGTP	2`-Desoxyguanosin-5`triphosphat
d.h.	das heißt
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2`DesoxyNukleotid5`Triphosphate
dTTP	2`-Desoxythymidin-5`triphosphat
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
E.coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EMT	Epithelial-Mesenchymal-Transition

eNOS	NO-Synthase aus Endothelzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	F luorescence A ctivated C ell S orter
FADD	Fas Associated protein with a Death Domain
FAK	Focal Adhesion Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
Flip	FLICE-like inhibitory protein
GADD45	G rowth A rrest and D NA D amage-inducible gene 45
GAP	GTPase Accelerating Protein
GDP	Guanosin 5`-diphosphat
GEF	Guaninnucleotide Exchange Factor
gld	generalized lymphoproliferative disease
G	Gap
GTP	Guanosin 5`-triphosphat
h	S tunde
HB-EGF	Heparin-Binding-Epidermal Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HEI-10	human enhancer of invasion-10
HMGB1	High-Mobility Group Box-1
IAP	I nhibitor of A ppoptosis P rotein
IBM	IAP Binding Motif
ICAD	Inhibitor of Caspase Activated DNase
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-BP	IGF-Binding Protein
IL	Interleukin
ILK	Integrin-Linked-Kinase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP	Immunopräzipitation
kDa	K ilo D alton
Konz.	Konzentration
LIF	L eukemia I nhibitory F actor
L-NAME	Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
lpr	lymphoproliferation
M	M itose
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEKK	MEK Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
MINOR	Mitogen-Inducible Nuclear Orphan Receptor
Mk	konditioniertes Medium
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Metalloproteinase
mnb	minibrain gene
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
Muri	Muristeron
n	A nzahl der E xperimente
ng	nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NOS	NO-Synthase
OSM	O ncostatin M
PAK	P 21- A ctivating K inase
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase

PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIGF	Placenta Growth Factor
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PTP	Permeability-Transition Pore
RNA	R ibonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S	S ynthese
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGK	Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase
SHMT	Serin-Hydroxymethyl-Transferase
Smac	Second mitochondrial activator of caspases
SNP	Sodium Nitroprussid
STABW	Standardabweichung
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	T abelle
tBid	truncated Bid
TFPI β	Tissue Factor Pathway Inhibitor β
TIMP-2	Tissue Inhibitor of MMP-2
TNF	Tumor Necrosis Factor
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Receptor 1
TUNEL	Terminale deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	U nit
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
unb.	unbehandelt
uPA	urokinasetype Plasminogen Activator
UV	Ultraviolett
V	V olt
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VF	Verdünnungsfaktor
WB	W estern Blot
x	M ittelwert
Z.B.	Z um Beispiel

7 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1.1 GRUNDPRINZIP DER APOPTOSE IN <i>C. ELEGANS</i>	3
ABB. 1.2 MECHANISMUS DER CASPASE-AKTIVIERUNG IN SÄUGERZELLEN	4
ABB. 1.3 DIE AKTIVIERUNG DES INTRINSICHEN SIGNALWEGES FÜHRT ZUR APOPTOSOMBILDUNG	6
ABB. 1.4 CD95-VERMITTELTE APOPTOSEKASKADE	8
ABB. 1.5 DIE BCL-2-FAMILIE	11
ABB. 1.6 DIE IAP-FAMILIE	12
ABB. 1.7 SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGE DER APOPTOSE UND MÖGLICHKEITEN DER INHIBIERUNG	16
ABB. 1.8 ZELLYKLUSREGULATION	20
ABB. 1.9 ZELLYKLUSABHÄNGIGE EXPRESSION DER CYCLINE	21
ABB. 1.10 TODESREZEPTOREN REGULIEREN APOPTOSE UND PROLIFERATION.....	25
ABB. 1.11 METASTASIERUNG.....	32
ABB. 2.1 TRANSWELL-KAMMER.....	53
ABB. 2.2 ZELLYKLUSVERTEILUNG IM FL2-A- HISTOGRAMM	60
ABB. 2.3 DISC-IP	72
ABB. 2.4 ZYTKIN-ARRAYS DER FIRMA RAY BIOTECH	74
ABB. 3.1 INDUZIERTER EXPRESSION DER CDK-INHIBITOREN P21 UND P27 IN RKO-ZELLEN NACH MURISTERON BEHANDLUNG FÜHRT ZU EINEM GO/G1-ZELLYKLUSARREST	83
ABB. 3.2 HCD95L-INDUZIERTER APOPTOSE.....	84
ABB. 3.3 HEMMUNG DER HCD95L- BZW. TRAIL- INDUZIERTEN APOPTOSE IN RKOP21- UND RKOP27-ZELLEN.....	85
ABB. 3.4 ÜBEREXPRESSION VON P27 SCHÜTZT RKO-ZELLEN VOR CD95-INDUZIERTER APOPTOSE.....	86
ABB. 3.5 RKOP27-ZELLEN BINDEN KEIN ANNEXIN V NACH HCD95L- BEHANDLUNG	87
ABB. 3.6 KEINE MORPHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN DER MIT HCD95L BEHANDELTEN RKOP27-ZELLEN	88
ABB. 3.7 GERINGFÜGIGE UNTERSCHIEDE IN DER EXPRESSION DER TODESREZEPTOREN CD95, TRAIL-R1, -R2, -R3 UND - R4 AUF DER ZELLOBERFLÄCHE DER RKO-ZELLEN.....	89
ABB. 3.8 KEIN UNTERSCHIED IN DER ZUSAMMENSETZUNG DES „DEATH INDUCING SIGNALING COMPLEX“ (DISC) NACH INKUBATION DER INDUZIERTEN UND NICHT INDUZIERTEN RKOP27-ZELLEN MIT HCD95L.....	90
ABB. 3.9 REDUZIERTE CASPASE-8-AKTIVITÄT IN INDUZIERTEN RKOP27-ZELLEN	91
ABB. 3.10 IN RKOP27-ZELLEN IST KEINE DEPOLARISIERUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS (MMP) NACHWEISBAR.....	92
ABB. 3.11 ERHÖHTE BCL-X _L PROTEINMENGEN IN P27-ÜBEREXPRIMIERENDEN RKO-ZELLEN.....	92
ABB. 3.12 VERMINDERTE CYTOCHROM C-FREISETZUNG DER IM ZELLYKLUS ARRETIERTEN RKOP27-ZELLEN.....	93
ABB. 3.13 KEINE CASPASE-3 AKTIVIERUNG IN HCD95L-BEHANDELTEN P27-ÜBEREXPRIMIERENDEN RKO-ZELLEN.....	94
ABB. 3.14 KEINE APOPTOSETYPISCHE DNA-FRAGMENTIERUNG (DNA-LEITER) IN RKOP27-ZELLEN NACH MURISTERON STIMULATION UND HCD95L-BEHANDLUNG.....	95
ABB. 3.15 EINE PMA-BEHANDLUNG FÜHRT BEI RKO-ZELLEN ZUM ZELLYKLUSARREST	96

ABB. 3.16 HEMMUNG DER PKC SENSITIVIERT MURISTERONSTIMULIERTE RKOP27-ZELLEN WIEDER FÜR CD95- UND TRAIL-INDUZIERTE APOPTOSE	97
ABB. 3.17 EINE HEMMUNG DER PKC SENSIBILISIERT MURISTERONSTIMULIERTE RKOP27-ZELLEN FÜR CD95L- UND TRAIL-INDUZIERTE APOPTOSE	97
ABB. 3.18 GRUNDSTRUKTUR DER ECDYSTEROIDE	98
ABB. 3.19 PROTEKTIVER EFFEKT DES ECDYSONHOMOLOGS MURISTERON	98
ABB. 3.20 PROTEKTIONSEFFEKT ALLER GETESTETEN INDUKTOREN	99
ABB. 3.21 MURISTERON AKTIVIERT DEN ANTI-APOPTOTISCHEN PI3K/AKT-SIGNALWEG	99
ABB. 3.22 EINE HEMMUNG DER CA ²⁺ -ABHÄNGIGEN PKC-ISOFORMEN HEBT DIE PROTEKTION DURCH MURISTERON NICHT VOLLSTÄNDIG AUF	100
ABB. 3.23 NACH ZUGABE DES ECDYSONHOMOLOGS MURISTERON ERHÖHT SICH DIE BCL-X _L PROTEINEXPRESSION	101
ABB. 3.24 MURISTERON HEMMT DIE CD95-VERMITTELTE APOPTOSE AUF DER STUFE DER CASPASE-8 AKTIVIERUNG	102
ABB. 3.25 CHARAKTERISIERUNG DER RKO10-ZELLEN	106
ABB. 3.26 KEIN EINFLUSS EINER TRANSIENTEN P27-EXPRESSION IN RKO-ZELLEN AUF DIE CD95-VERMITTELTE APOPTOSE	107
ABB. 3.27 EINE TRANSIENTE P21- UND P27- ÜBEREXPRESSION INHIBIERT NICHT DIE TODESREZEPTORVERMITTELTE APOPTOSE IN RKO-ZELLEN	109
ABB. 3.28 SYNCHRONISATION DER RKO-ZELLEN IN G0/G1 DURCH SERUMENTZUG	110
ABB. 3.29 SYNCHRONISIERUNG VON CHO-ZELLEN DURCH REDUZIERTEN SERUMGEHALT	111
ABB. 3.30 SYNCHRONISIERUNG VON NIH3T3-MAUSZELLEN DURCH SERUMENTZUG	112
ABB. 3.31 APOPTOSERESISTENZ SYNCHRONISierter NIH 3T3-ZELLEN GEGENÜBER CD95-VERMITTELTEM ZELLTOD	113
ABB. 3.32 CD95-INDUZIERTE APOPTOSE FÜHRT ZU EINER ANSAMMLUNG DER ÜBERLEBENDEN RKO-ZELLEN IN DER G0/G1-ZELLZYKLUSPHASE	113
ABB. 3.33 ZELLZYKLUSVERTEILUNG ÜBERLEBENDER ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER HCD95L-KONZENTRATION UND -INKUBATIONSZEIT	114
ABB. 3.34 GERINGERER ANTEIL CASPASE-3-AKTIVER RKO-ZELLEN IN DER G0/G1-ZELLZYKLUSPHASE NACH HCD95L-BEHANDLUNG	116
ABB. 3.35 ZELLZYKLUSVERTEILUNG APOPTOTISCHER RKO-ZELLEN NACH CD95L-BEHANDLUNG OHNE CHX	117
ABB. 3.36 CYCLIN B1- UND CYCLIN E- EXPRIMIERENDE ZELLEN WERDEN DURCH HCD95L-BEHANDLUNG NICHT GETÖTET	118
ABB. 3.37 ZELLDICHTE UND VERBRAUCHTES MEDIUM BEEINFLUSSEN DIE MORPHOLOGIE UND HEMMEN DIE APOPTOSE VON RKO-ZELLEN	120
ABB. 3.38 DICHTEARRETIERUNG UND RKO-KONDITIONIERTES MEDIUM (Mk) HEMMEN DIE CD95-VERMITTELTE APOPTOSE IN RKO-ZELLEN	121
ABB. 3.39 KONFLUENZ UND KONDITIONIERTES MEDIUM VON DICHTGEWACHSENEN ZELLEN VERLANGSAMEN DIE PROLIFERATION DER RKO-ZELLEN	122
ABB. 3.40 DIE CD95-EXPRESSION AUF DER ZELLOBERFLÄCHE DER RKO-ZELLEN BLEIBT UNBEEINFLUSST DURCH UNTERSCHIEDLICHE ZELLDICHTE ODER DIE ZUGABE KONDITIONIERTEN MEDIUMS	123
ABB. 3.41 KEIN UNTERSCHIED IN DER CD95-DISC-ZUSAMMENSETZUNG NACH REZEPTORAKTIVIERUNG IN DICHT UND DÜNN AUSGESÄTEN RKO-ZELLEN	124
ABB. 3.42 VERMINDERTE CASPASE-8-AKTIVITÄT SOWOHL IN DEN DICHTEARRETIIERTEN ALS AUCH IN MIT KONDITIONIERTEM MEDIUM (Mk) BEHANDELTEN RKO-ZELLEN	125
ABB. 3.43 QUANTIFIZIERUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIALS $\Delta\Psi_m$	126

ABB. 3.44 ERHÖHTE BCL- χ_L -EXPRESSION SOWOHL IN KONFLUENTEN ALS AUCH IN DÜNN AUSGESÄTEN RKO-ZELLEN, DIE MIT KONDITIONIERTEM MEDIUM BEHANDELT WURDEN	127
ABB. 3.45 CYTOCHROM C-FREISETZUNG AUS RKO-ZELLEN NACH HCD95L-STIMULUS	128
ABB. 3.46 CASPASE-3-AKTIVITÄT IN HCD95L-BEHANDELTEN RKO-ZELLEN	128
ABB. 3.47 RKO-ZELLEN PRODUZIEREN EINEN ANTI-APOPTOTISCH WIRKENDEN ZELLKULTURÜBERSTAND.....	130
ABB. 3.48 RKO-ZELLEN SEKRETIEREN ZYTOKINE IN DEN ZELLKULTURÜBERSTAND	131
ABB. 3.49 APOPTOSEVERHALTEN DER RKO SUSPENSIONSKULTUREN.....	133
ABB. 3.50 HCD95L BLIEB IM ÜBERSTAND DER RKO-ZELLEN INTAKT	134
ABB. 3.51 DER APOPTOSEHEMMENDE FAKTOR IN KONDITIONIERTEM RKO-MEDIUM WIRKT KONZENTRATIONSABHÄNGIG UND WIRD AUCH IN SERUMFREIES MEDIUM SEKRETIIERT.....	135
ABB. 3.52 TRYPSINVERDAU DES KONDITIONIERTEN MEDIUMS HEBT DIE PROTEKTION NICHT AUF	137
ABB. 3.53 UNTERSCHIEDLICHES APOPTOSEVERHALTEN DER ZELLINIEN HELa, CHO UND NIH 3T3 NACH INKUBATION MIT KONDITIONIERTEM MEDIUM	138
ABB. 3.54 NACH BEHANDLUNG MIT KONDITIONIERTEM MEDIUM ABGELÖSTE RKO- UND HELa-, ABER NICHT CHO- UND NIH 3T3-ZELLEN, LEBEN UND PROLIFERIEREN.....	139
ABB. 3.55 HEMMUNG DER UV-, TRAIL-, STAUROSPORIN-, ABER NICHT ANTI-CD95-AK-INDUZIERTEN APOPTOSE DURCH KONDITIONIERTES RKO-MEDIUM	140
ABB. 3.56 DIE ROLLE DER PI3K FÜR DIE PRODUKTION PROTEKTIVEN MEDIUMS	142
ABB. 3.57 CA ²⁺ -ABHÄNGIGE PKC-ISOFORMEN SPIELEN EINE ROLLE FÜR DIE ANTI-APOPTOTISCHE WIRKUNG DES KONDITIONIERTEN RKO-MEDIUMS	143
ABB. 3.58 KONDITIONIERTES MEDIUM VERSTÄRKT DAS MIGRATIONSPOTENTIAL VON RKO-ZELLEN.....	144
ABB. 3.59 DURCHFLUßZYTOTOMETRISCHE BESTIMMUNG CFSE-GEFÄRBTER INVASIVER RKO-ZELLEN	146
ABB. 3.60 PI3K- UND PKC-AKTIVITÄT SPIELEN KEINE ROLLE FÜR DIE DURCH KONDITIONIERTES MEDIUM INDUZIERT MIGRATION DER RKO-ZELLEN	147
ABB. 4.1 MODELL DER IN RKO-ZELLEN STATTFINDENDEN VERÄNDERUNGEN BEI KONFLUENTEM WACHSTUM BZW. BEI BEHANDLUNG MIT KONDITIONIERTEM RKO-MEDIUM.....	185

8 Tabellenverzeichnis

TAB. 2.1: APOPTOSEINDUKTION IN RKO-ZELLEN.....	52
TAB. 2.2: ZUR SYNCHRONISATION VERWENDETE SUBSTANZEN.....	55
TAB. 2.3: DETEKTION VERWENDETER FLUOROCROME IM FACS.....	58
TAB. 2.4: ERSTANTIKÖRPER UND DIE DAMIT BENUTZTEN FLUOROCHEMGEKOPPELTEN ZWEITANTIKÖRPER.....	63
TAB. 2.5: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER ZUM IMMUNOCHEMISCHEN NACHWEIS VON PROTEINEN:.....	70
TAB. 3.1: VERGLEICH DER INDUKTOREN FÜR DAS ECDYSONSYSTEM.....	83
TAB. 3.2: EFFEKTE DES STEROIDHORMONS MURISTERONS AUF DIE GENEXPRESSION DER RKO ZELLEN.....	104
TAB. 3.3: INDUKTION DES p27-ARIAD-SYSTEMS IN EINER AUSWAHL SELEKTIONIERTER RKO-ZELLKLONE.....	105
TAB. 3.4: ANTEIL AN RKO-ZELLEN IM SUBG1-BEREICH NACH HCD95L-BEHANDLUNG.....	115
TAB. 3.5: ANTEIL AN CASPASE-3-POSITIVEN RKO-ZELLEN NACH HCD95L-BEHANDLUNG.....	116
TAB. 3.6: EXPRESSION DER CYCLINE IN RKO-ZELLEN.....	119
TAB. 3.7: UNTERSCHIEDLICHE BEHANDLUNGEN DES KONDITIONIERTEN RKO-MEDIUMS ZUR UNTERSUCHUNG SEINER PROTEKTIVEN EIGENSCHAFT.....	132
TAB. 3.8: UNTERSCHIEDLICHE BEHANDLUNGEN DES VERBRAUCHTEN KONDITIONIERTEN MEDIUMS ZUR UNTERSUCHUNG SEINER PROTEKTIVEN EIGENSCHAFT.....	136
TAB. 3.9 DIE ZUGABE VON GÖ6976 DIREKT ZU KONDITIONIERTEM MEDIUM BEEINFLUSST KAUM DESSEN PROTEKTIVEN EFFEKT.....	143
TAB. 3.10: GESAMTHEIT IN DÜNN UND DICHT AUSGESÄTEN RKO-ZELLEN UNTERSCHIEDLICH REGULIERTER GENE.....	148
TAB. 3.11: VIELE GENE WERDEN IN DÜNN AUSGESÄTEN ZELLEN IN GERINGEREM AUSMAß EXPRIERT ALS IN DICHT AUSGESÄTEN RKO-ZELLEN.....	150
TAB. 3.12: NUR IN ANSATZ 1 (DÜNN - DICHT) UNTERSCHIEDLICH REGULIERTE GENE.....	150
TAB. 3.13: NUR IN ANSATZ 3 (DÜNN HCD95L- DICHT HCD95L) UNTERSCHIEDLICH REGULIERTE GENE.....	151

9 Literaturverzeichnis

- Abdollahi, T., Robertson, N. M., Abdollahi, A., Litwack, G. (2003). "Identification of interleukin 8 as an inhibitor of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in the ovarian carcinoma cell line OVCAR3." *Cancer Res* **63**(15): 4521-6.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* **9**(2): 423-32.
- Adams, J. C., Kureishy, N., Taylor, A. L. (2001). "A role for syndecan-1 in coupling fascin spike formation by thrombospondin-1." *J Cell Biol* **152**(6): 1169-82.
- Aigner, S., C. L. Ramos, A. Hafezi-Moghadam, M. B. Lawrence, J. Friederichs, P. Altevogt and K. Ley (1998). "CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin." *Faseb J* **12**(12): 1241-51.
- Algeciras-Schimmich, A., Peter, M. E. (2003). "Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells." *FEBS Lett* **546**(2-3): 185-8.
- Algeciras-Schimmich, A., Pietras, E. M., Barnhart, B. C., Legembre, P., Vijayan, S., Holbeck, S. L., Peter, M. E. (2003). "Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11445-50.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K., Peter, M. E. (2002). "Molecular ordering of the initial signaling events of CD95." *Mol Cell Biol* **22**(1): 207-20.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Amb, S., W. G. Merriam, W. P. Bennett, E. Felley-Bosco, M. O. Ogunfusika, S. M. Oser, S. Klein, P. G. Shields, T. R. Billiar and C. C. Harris (1998). "Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression." *Cancer Res* **58**(2): 334-41.
- Angelucci, C., G. Lama, F. Iacopino, D. Maglione and G. Sica (2001). "Effect of placenta growth factor-1 on proliferation and release of nitric oxide, cyclic AMP and cyclic GMP in human epithelial cells expressing the FLT-1 receptor." *Growth Factors* **19**(3): 193-206.
- Aragane, Y., D. Kulms, D. Metze, G. Wilkes, B. Poppelmann, T. A. Luger and T. Schwarz (1998). "Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L." *J Cell Biol* **140**(1): 171-82.
- Asada, M., T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro and S. Mizutani (1999). "Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation." *Embo J* **18**(5): 1223-34.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 420-30.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.
- Baehrecke, E. H. (2002). "How death shapes life during development." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(10): 779-87.
- Barata, J. T., A. A. Cardoso, L. M. Nadler and V. A. Boussiotis (2001). "Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1)." *Blood* **98**(5): 1524-31.
- Baus, F., V. Gire, D. Fisher, J. Piette and V. Dulic (2003). "Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts." *Embo J* **22**(15): 3992-4002.

- Baxa, D. M. and F. K. Yoshimura (2003). "Genistein reduces NF-kappa B in T lymphoma cells via a caspase-mediated cleavage of I kappa B alpha." Biochem Pharmacol **66**(6): 1009-18.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-10.
- Bernards, R. (2003). "Cancer: cues for migration." Nature **425**(6955): 247-8.
- Berzins, S. P., D. I. Godfrey, J. F. Miller and R. L. Boyd (1999). "A central role for thymic emigrants in peripheral T cell homeostasis." Proc Natl Acad Sci U.S.A **96**(17): 9787-91.
- Billuart, P., Biennu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Roest Crollius H, Carrie A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. (1998). "Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation." Nature **392**(6679): 923-6.
- Blain, S. W., H. I. Scher, C. Cordon-Cardo and A. Koff (2003). "p27 as a target for cancer therapeutics." Cancer Cell **3**(2): 111-5.
- Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). "uPAR: a versatile signalling orchestrator." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 932-43.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Caspase activation." Biochem Soc Symp(70): 233-42.
- Bodner-Adler, B., L. Hefler, K. Bodner, S. Leodolter, K. Frischmuth, C. Kainz and K. Mayerhofer (2001). "Serum levels of angiogenin (ANG) in invasive cervical cancer and in cervical intraepithelial neoplasia (CIN)." Anticancer Res **21**(1B): 809-12.
- Bossy-Wetzel, E. and D. R. Green (2000). "Assays for cytochrome c release from mitochondria during apoptosis." Methods Enzymol **322**: 235-42.
- Brezniceanu, M. L., K. Volp, S. Bosser, C. Solbach, P. Lichter, S. Joos and M. Zornig (2003). "HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma." FASEB J **17**(10): 1295-7.
- Bringuier, P. P., R. Umbas, H. E. Schaafsma, H. F. Karthaus, F. M. Debruyne and J. A. Schalken (1993). "Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors." Cancer Res **53**(14): 3241-5.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley and D. A. Cheresh (1996). "Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3." Cell **85**(5): 683-93.
- Bruhat, A., Averous, J., Carraro, V., Zhong, C., Reimold, A. M., Kilberg, M. S. and Fournoux, P. (2002). "Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response." J Biol Chem **277**(50): 48107-48114.
- Brunet, A., J. Park, H. Tran, L. S. Hu, B. A. Hemmings and M. E. Greenberg (2001). "Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a)." Mol Cell Biol **21**(3): 952-65.
- Brunner, B., E. Gunsilius, P. Schumacher, H. Zwierzina, G. Gastl and R. Stauder (2002). "Blood levels of angiogenin and vascular endothelial growth factor are elevated in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia." J Hematother Stem Cell Res **11**(1): 119-25.
- Budd, R. C. (2002). "Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis." J Clin Invest **109**(4): 437-41.
- Cakouros, D., Daish T, Martin D, Baehrecke EH, Kumar S. (2002). "Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in Drosophila is regulated by Broad-Complex." J Cell Biol **157**(6): 985-95.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-21.
- Cerione, R. A. and Y. Zheng (1996). "The Dbl family of oncogenes." Curr Opin Cell Biol **8**(2): 216-22.

- Chadebech, P., I. Truchet, L. Bricese and A. Valette (2000). "Up-regulation of cdc2 protein during paclitaxel-induced apoptosis." Int J Cancer **87**(6): 779-86.
- Chandrasekar, N., S. Mohanam, M. Gujrati, W. C. Olivero, D. H. Dinh and J. S. Rao (2003). "Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells." Oncogene **22**(3): 392-400.
- Chang, D. W., Z. Xing, V. L. Capacio, M. E. Peter and X. Yang (2003). "Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation." Embo J **22**(16): 4132-42.
- Chau, B. N. and J. Y. Wang (2003). "Coordinated regulation of life and death by RB." Nat Rev Cancer **3**(2): 130-8.
- Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J. P. Shapiro, M. J. Brauer, M. C. Kiefer, P. J. Barr and J. D. Mountz (1994). "Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule." Science **263**(5154): 1759-62.
- Cheng, N., Y. M. Janumyan, L. Didion, C. Van Hofwegen, E. Yang and C. M. Knudson (2004). "Bcl-2 inhibition of T-cell proliferation is related to prolonged T-cell survival." Oncogene.
- Cheng, T. L., Symons, M., Jou, T. S. (2004). "Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1." Exp Cell Res **295**(2): 497-511.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler and D. R. Green (2004). "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis." Science **303**(5660): 1010-4.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326** (Pt 1): 1-16.
- Conradt, B. and H. R. Horvitz (1998). "The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9." Cell **93**(4): 519-29.
- Constantino, S., R. Santos, S. Gisselbrecht and F. Gouilleux (2001). "The ecdysone inducible gene expression system: unexpected effects of muristerone A and ponasterone A on cytokine signaling in mammalian cells." Eur Cytokine Netw **12**(2): 365-7.
- Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" Trends Cell Biol **13**(2): 65-70.
- Crook, N. E., R. J. Clem and L. K. Miller (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**(4): 2168-74.
- Cross, T., G. Griffiths, E. Deacon, R. Sallis, M. Gough, D. Watters and J. M. Lord (2000). "PKC-delta is an apoptotic lamin kinase." Oncogene **19**(19): 2331-7.
- Cross, T. G., D. Scheel-Toellner, N. V. Henriquez, E. Deacon, M. Salmon and J. M. Lord (2000). "Serine/threonine protein kinases and apoptosis." Exp Cell Res **256**(1): 34-41.
- Damsky, C. H. and D. Ilic (2002). "Integrin signaling: it's where the action is." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 594-602.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-41.
- Denning, M. F., Y. Wang, B. J. Nickoloff and T. Wrone-Smith (1998). "Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes." J Biol Chem **273**(45): 29995-30002.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-52.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Sause, A., Zeiher, A. M. (1998). "Nitric oxide inhibits APO-1/Fas-mediated cell death." Cell Growth Differ **9**(5): 415-22.

- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(1): 11-22.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-74.
- Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee and P. R. Young (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* **273**(23): 14363-7.
- Emoto, Y., Y. Manome, G. Meinhardt, H. Kasaki, S. Kharbanda, M. Robertson, T. Ghayur, W. W. Wong, R. Kamen, R. Weichselbaum and et al. (1995). "Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells." *Embo J* **14**(24): 6148-56.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Esques, R., S. Desagher, B. Antonsson and J. C. Martinou (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." *Mol Cell Biol* **20**(3): 929-35.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." *Nature* **420**(6916): 629-35.
- Etoh, T., K. Shibuta, G. F. Barnard, S. Kitano and M. Mori (2000). "Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration." *Clin Cancer Res* **6**(9): 3545-51.
- Ewton, D. Z., Lee K, Deng X, Lim S, Friedman E. (2003). "Rapid turnover of cell-cycle regulators found in Mirk/dyrk1B transfectants." *Int J Cancer* **103**(1): 21-8.
- Fero, M. L., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky and J. M. Roberts (1996). "A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice." *Cell* **85**(5): 733-44.
- Fett, J. W., D. J. Strydom, R. R. Lobb, E. M. Alderman, J. L. Bethune, J. F. Riordan and B. L. Vallee (1985). "Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells." *Biochemistry* **24**(20): 5480-6.
- Fogel, M., J. Friederichs, Y. Zeller, M. Husar, A. Smirnov, L. Roitman, P. Altevogt and Z. M. Stoeber (1999). "CD24 is a marker for human breast carcinoma." *Cancer Lett* **143**(1): 87-94.
- Friedl, P., P. Vischer and M. A. Freyberg (2002). "The role of thrombospondin-1 in apoptosis." *Cell Mol Life Sci* **59**(8): 1347-57.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." *Nat Rev Cancer* **3**(5): 362-74.
- Frisch, S. M. (2000). "Anoikis." *Methods Enzymol* **322**: 472-9.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 555-62.
- Fulton, D., J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos and W. C. Sessa (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." *Nature* **399**(6736): 597-601.
- Furukawa, Y., S. Iwase, J. Kikuchi, Y. Terui, M. Nakamura, H. Yamada, Y. Kano and M. Matsuda (2000). "Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation." *J Biol Chem* **275**(28): 21661-7.

- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov and K. M. Yamada (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(11): 793-805.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." *Science* **285**(5430): 1028-32.
- Giodini, A., M. J. Kallio, N. R. Wall, G. J. Gorbisky, S. Tognin, P. C. Marchisio, M. Symons and D. C. Altieri (2002). "Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin." *Cancer Res* **62**(9): 2462-7.
- Giuliano, M., G. Bellavia, M. Lauricella, A. D'Anneo, B. Vassallo, R. Vento and G. Tesoriere (2004). "Staurosporine-induced apoptosis in Chang liver cells is associated with down-regulation of Bcl-2 and Bcl-XL." *Int J Mol Med* **13**(4): 565-71.
- Glotzer, M. (2001). "Animal cell cytokinesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 351-86.
- Gnesutta, N. and A. Minden (2003). "Death receptor-induced activation of initiator caspase 8 is antagonized by serine/threonine kinase PAK4." *Mol Cell Biol* **23**(21): 7838-48.
- Gomez-Angelats, M., Bortner CD, Cidlowski JA. (2000). "Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases." *J Biol Chem* **275**(26): 19609-19.
- Gomez-Angelats, M. and J. A. Cidlowski (2001). "Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* **276**(48): 44944-52.
- Gougeon, M. L., E. Ledru, H. Lecoecur and S. Garcia (1998). "T cell apoptosis in HIV infection: mechanisms and relevance for AIDS pathogenesis." *Results Probl Cell Differ* **24**: 233-48.
- Green, C. J., P. Lichtlen, N. T. Huynh, M. Yanovsky, K. R. Laderoute, W. Schaffner and B. J. Murphy (2001). "Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1." *Cancer Res* **61**(6): 2696-703.
- Grossman, D., P. J. Kim, J. S. Schechner and D. C. Altieri (2001). "Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(2): 635-40.
- Gu, Y., C. Sarnecki, R. A. Aldape, D. J. Livingston and M. S. Su (1995). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2." *J Biol Chem* **270**(32): 18715-8.
- Guimbaud, R., V. Abitbol, V. Bertrand, G. Quartier, L. Chauvelot-Moachon, J. Giroud, D. Couturier and D. C. Chaussade (1998). "Leukemia inhibitory factor involvement in human ulcerative colitis and its potential role in malignant course." *Eur Cytokine Netw* **9**(4): 607-12.
- Guimera, J., Casas C, Pucharcos C, Solans A, Domenech A, Planas AM, Ashley J, Lovett M, Estivill X, Pritchard MA. (1996). "A human homologue of Drosophila minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region." *Hum Mol Genet* **5**(9): 1305-10.
- Gutcher, I., P. R. Webb and N. G. Anderson (2003). "The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C." *Cell Mol Life Sci* **60**(6): 1061-70.
- Hakem, A., T. Sasaki, I. Kozieradzki and J. M. Penninger (1999). "The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis." *J Exp Med* **189**(6): 957-68.
- Han, Q., J. Leng, D. Bian, C. Mahanivong, K. A. Carpenter, Z. K. Pan, J. Han and S. Huang (2002). "Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 pathway promotes urokinase plasminogen activator mRNA stability in invasive breast cancer cells." *J Biol Chem* **277**(50): 48379-85.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hancock, J. F. (2003). "Ras proteins: different signals from different locations." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(5): 373-84.

- Hanks, S. K., L. Ryzhova, N. Y. Shin and J. Brabek (2003). "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility." *Front Biosci* **8**: d982-96.
- Harper, N., M. A. Hughes, S. N. Farrow, G. M. Cohen and M. MacFarlane (2003). "Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling." *J Biol Chem* **278**(45): 44338-47.
- Hatzi, E. and J. Badet (1999). "Expression of receptors for human angiogenin in vascular smooth muscle cells." *Eur J Biochem* **260**(3): 825-32.
- Hedvat, C. V., Irving S.G. (1995). "The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor." *Mol Endocrinol* **9**(12): 1692-700.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A. S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." *J Biol Chem* **277**(1): 432-8.
- Hengartner, M. O. and H. R. Horvitz (1994). "C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2." *Cell* **76**(4): 665-76.
- Higashi, K. and H. Ogawara (1994). "Daidzein inhibits insulin- or insulin-like growth factor-1-mediated signaling in cell cycle progression of Swiss 3T3 cells." *Biochim Biophys Acta* **1221**(1): 29-35.
- Hinck, L., W. J. Nelson and J. Papkoff (1994). "Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin." *J Cell Biol* **124**(5): 729-41.
- Hingorani, R., B. Bi, T. Dao, Y. Bae, A. Matsuzawa and I. N. Crispe (2000). "CD95/Fas signaling in T lymphocytes induces the cell cycle control protein p21cip-1/WAF-1, which promotes apoptosis." *J Immunol* **164**(8): 4032-6.
- Hirohashi, S. and Y. Kanai (2003). "Cell adhesion system and human cancer morphogenesis." *Cancer Sci* **94**(7): 575-81.
- Hofmann, K. (1999). "The modular nature of apoptotic signaling proteins." *Cell Mol Life Sci* **55**(8-9): 1113-28.
- Holmstrom, T. H., I. Schmitz, T. S. Soderstrom, M. Poukkula, V. L. Johnson, S. C. Chow, P. H. Krammer and J. E. Eriksson (2000). "MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly." *Embo J* **19**(20): 5418-28.
- Hu, G., J. F. Riordan and B. L. Vallee (1994). "Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12096-100.
- Hu, G., C. Xu and J. F. Riordan (2000). "Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA." *J Cell Biochem* **76**(3): 452-62.
- Hu, G. F. and J. F. Riordan (1993). "Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation." *Biochem Biophys Res Commun* **197**(2): 682-7.
- Hu, G. F., D. J. Strydom, J. W. Fett, J. F. Riordan and B. L. Vallee (1993). "Actin is a binding protein for angiogenin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1217-21.
- Hu, W. H., H. Johnson and H. B. Shu (2000). "Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8." *J Biol Chem* **275**(15): 10838-44.
- Hu, X., M. Bryington, A. B. Fisher, X. Liang, X. Zhang, D. Cui, I. Datta and K. S. Zuckerman (2002). "Ubiquitin/proteasome-dependent degradation of D-type cyclins is linked to tumor necrosis factor-induced cell cycle arrest." *J Biol Chem* **277**(19): 16528-37.
- Hua, Z. C., S. J. Sohn, C. Kang, D. Cado and A. Winoto (2003). "A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region." *Immunity* **18**(4): 513-21.
- Huang, D. C., J. Tschopp and A. Strasser (2000). "Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells." *Cell Death Differ* **7**(8): 754-5.

- Huang, R. P., R. Huang, Y. Fan and Y. Lin (2001). "Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system." *Anal Biochem* **294**(1): 55-62.
- Huang, S., L. Mills, B. Mian, C. Tellez, M. McCarty, X. D. Yang, J. M. Gudas and M. Bar-Eli (2002). "Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma." *Am J Pathol* **161**(1): 125-34.
- Hueber, A. O., M. Zornig, D. Lyon, T. Suda, S. Nagata and G. I. Evan (1997). "Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis." *Science* **278**(5341): 1305-9.
- Ino, Y., M. Gotoh, M. Sakamoto, K. Tsukagoshi and S. Hirohashi (2002). "Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 365-70.
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French and J. Tschopp (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-5.
- Iwamoto, T., T. Senga, K. Adachi and M. Hamaguchi (2004). "Stat3-dependent induction of interleukin-3 receptor expression in leukemia inhibitory factor-stimulated M1 mouse leukemia cells." *Cytokine* **25**(3): 136-9.
- Jadeski, L. C., K. O. Hum, C. Chakraborty and P. K. Lala (2000). "Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis." *Int J Cancer* **86**(1): 30-9.
- Jin, S., L. Mazzacurati, X. Zhu, T. Tong, Y. Song, S. Shujuan, K. L. Petrik, B. Rajasekaran, M. Wu and Q. Zhan (2003). "Gadd45a contributes to p53 stabilization in response to DNA damage." *Oncogene* **22**(52): 8536-40.
- Kainulainen, V., M. Sundvall, J. A. Maatta, E. Santiestevan, M. Klagsbrun and K. Elenius (2000). "A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis." *J Biol Chem* **275**(12): 8641-9.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh and M. Seiki (2001). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration." *J Cell Biol* **153**(5): 893-904.
- Kalabis, J., M. J. Patterson, G. H. Enders, B. Marian, R. V. Iozzo, G. Rogler, P. A. Gimotty and M. Herlyn (2003). "Stimulation of human colonic epithelial cells by leukemia inhibitory factor is dependent on collagen-embedded fibroblasts in organotypic culture." *Faseb J* **17**(9): 1115-7.
- Kamohara, H., K. Sakamoto, T. Ishiko, S. Mita, Y. Masuda, T. Abe and M. Ogawa (1994). "Human carcinoma cell lines produce biologically active leukemia inhibitory factor (LIF)." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **85**(2): 131-40.
- Kaneko, T., H. Konno, M. Baba, T. Tanaka and S. Nakamura (2003). "Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer." *Cancer Sci* **94**(1): 43-9.
- Kang, M. J., H. S. Ahn, J. Y. Lee, S. Matsushashi and W. Y. Park (2002). "Up-regulation of PDCD4 in senescent human diploid fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 617-21.
- Karin, M., Y. Cao, F. R. Greten and Z. W. Li (2002). "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 301-10.
- Kataoka, T., R. C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Irmeler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacsovic and J. Tschopp (2000). "The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways." *Curr Biol* **10**(11): 640-8.
- Kauffmann-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciano, E. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward and G. Evan (1997). "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB." *Nature* **385**(6616): 544-8.
- Kaufmann, S. H., P. W. Mesner, Jr., K. Samejima, S. Tone and W. C. Earnshaw (2000). "Detection of DNA cleavage in apoptotic cells." *Methods Enzymol* **322**: 3-15.
- Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J., Budd, R. C. (1999). "Caspase activation is required for T cell proliferation." *J Exp Med* **190**(12): 1891-6.

- Kerr, J. F., Wyllie AH, Currie AR (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Kirchhoff, S., W. W. Muller, A. Krueger, I. Schmitz and P. H. Krammer (2000). "TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity." *J Immunol* **165**(11): 6293-300.
- Kirkin, V., S. Joos and M. Zornig (2004). "The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis." *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 229-49.
- Kirsch, D. G., A. Doseff, B. N. Chau, D. S. Lim, N. C. de Souza-Pinto, R. Hansford, M. B. Kastan, Y. A. Lazebnik and J. M. Hardwick (1999). "Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c." *J Biol Chem* **274**(30): 21155-61.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *Embo J* **14**(22): 5579-88.
- Knippers, R. (2001). "Molekulare Genetik. 8. neu überarbeitete Auflage." *Thieme Verlag*.
- Kool, J., M. Hamdi, P. Cornelissen-Steijger, A. J. van der Eb, C. Terleth and H. van Dam (2003). "Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2." *Oncogene* **22**(27): 4235-42.
- Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals and M. H. van Oers (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." *Blood* **84**(5): 1415-20.
- Korsmeyer, S. J. (1999). "BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death." *Cancer Res* **59**(7 Suppl): 1693s-1700s.
- Kothakota, S., T. Azuma, C. Reinhard, A. Klippel, J. Tang, K. Chu, T. J. McGarry, M. W. Kirschner, K. Kohts, D. J. Kwiatkowski and L. T. Williams (1997). "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science* **278**(5336): 294-8.
- Koya, R. C., H. Fujita, S. Shimizu, M. Ohtsu, M. Takimoto, Y. Tsujimoto and N. Kuzumaki (2000). "Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release." *J Biol Chem* **275**(20): 15343-9.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* **407**(6805): 789-95.
- Kranenburg, O., M. F. Gebbink and E. E. Voest (2004). "Stimulation of angiogenesis by Ras proteins." *Biochim Biophys Acta* **1654**(1): 23-37.
- Kritikou, E. A., A. Sharkey, K. Abell, P. J. Came, E. Anderson, R. W. Clarkson and C. J. Watson (2003). "A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland." *Development* **130**(15): 3459-68.
- Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer and S. Kirchhoff (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* **276**(23): 20633-40.
- Kuhnel, F., L. Zender, Y. Paul, M. K. Tietze, C. Trautwein, M. Manns and S. Kubicka (2000). "NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis." *J Biol Chem* **275**(9): 6421-7.
- Lalande, M. (1990). "A reversible arrest point in the late G1 phase of the mammalian cell cycle." *Exp Cell Res* **186**(2): 332-9.
- Lander, H. M., J. S. Ogiste, S. F. Pearce, R. Levi and A. Novogrodsky (1995). "Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras." *J Biol Chem* **270**(13): 7017-20.
- Landgren, E., P. Schiller, Y. Cao and L. Claesson-Welsh (1998). "Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1." *Oncogene* **16**(3): 359-67.

- Lawler, J. (2002). "Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." *J Cell Mol Med* **6**(1): 1-12.
- Leder, S., Czajkowska H, Maenz B, De Graaf K, Barthel A, Joost HG, Becker W. (2003). "Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties." *Biochem J*. **372**(Pt 3): 881-8.
- Lenardo, M. J. (2003). "Molecular regulation of T lymphocyte homeostasis in the healthy and diseased immune system." *Immunol Res* **27**(2-3): 387-98.
- Lens, S. M., T. Kataoka, K. A. Fortner, A. Tinel, I. Ferrero, R. H. MacDonald, M. Hahne, F. Beermann, A. Attinger, H. A. Orbea, R. C. Budd and J. Tschopp (2002). "The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes." *Mol Cell Biol* **22**(15): 5419-33.
- Li, A., S. Dubey, M. L. Varney, B. J. Dave and R. K. Singh (2003). "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis." *J Immunol* **170**(6): 3369-76.
- Li, F., G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio and D. C. Altieri (1998). "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin." *Nature* **396**(6711): 580-4.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Li, J., T. R. Billiar, R. V. Talanian and Y. M. Kim (1997). "Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation." *Biochem Biophys Res Commun* **240**(2): 419-24.
- Li, K., Zhao S, Karur V, Wojchowski DM. (2002). "DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival." *J Biol Chem* **277**(49): 47052-60.
- Liang, J., J. Zubovitz, T. Petrocelli, R. Kotchetkov, M. K. Connor, K. Han, J. H. Lee, S. Ciarallo, C. Catzavelos, R. Beniston, E. Franssen and J. M. Slingerland (2002). "PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." *Nat Med* **8**(10): 1153-60.
- Limpens, J., R. Stad, C. Vos, C. de Vlaam, D. de Jong, G. J. van Ommen, E. Schuurung and P. M. Kluin (1995). "Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals." *Blood* **85**(9): 2528-36.
- Linossier, C., M. Pierre, J. B. Le Pecq and J. Pierre (1990). "Mechanisms of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase activity." *Biochem Pharmacol* **39**(1): 187-93.
- Lindsten, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor and C. B. Thompson (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* **6**(6): 1389-99.
- Lissy, N. A., L. F. Van Dyk, M. Becker-Hapak, A. Vocero-Akbani, J. H. Mendler and S. F. Dowdy (1998). "TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point." *Immunity* **8**(1): 57-65.
- Lloyd, R. V., L. A. Erickson, L. Jin, E. Kulig, X. Qian, J. C. Cheville and B. W. Scheithauer (1999). "p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers." *Am J Pathol* **154**(2): 313-23.
- Lorenzo, H. K., S. A. Susin, J. Penninger and G. Kroemer (1999). "Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death." *Cell Death Differ* **6**(6): 516-24.
- Lu, Z., A. Hornia, Y. W. Jiang, Q. Zang, S. Ohno and D. A. Foster (1997). "Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta." *Mol Cell Biol* **17**(6): 3418-28.
- Luthman, H. and G. Magnusson (1983). "High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells." *Nucleic Acids Res* **11**(5): 1295-308.
- Mahidhara, R. S., R. A. Hoffman, S. Huang, A. Wolf-Johnston, Y. Vodovotz, R. L. Simmons and T. R. Billiar (2003). "Nitric oxide-mediated inhibition of caspase-dependent T lymphocyte proliferation." *J Leukoc Biol* **74**(3): 403-11.

- Mahtouk, K., M. Jourdan, J. De Vos, C. Hertogh, G. Fiol, E. Jourdan, J. F. Rossi and B. Klein (2004). "An inhibitor of the EGF receptor family blocks myeloma cell growth factor activity of HB-EGF and potentiates dexamethasone or anti-IL-6 antibody-induced apoptosis." *Blood* **103**(5): 1829-37.
- Majewski, M., M. Nieborowska-Skorska, P. Salomoni, A. Slupianek, K. Reiss, R. Trotta, B. Calabretta and T. Skorski (1999). "Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt." *Cancer Res* **59**(12): 2815-9.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(3): 222-31.
- Manes, S., E. Mira, M. M. Barbacid, A. Cipres, P. Fernandez-Resa, J. M. Buesa, I. Merida, M. Aracil, G. Marquez and A. C. Martinez (1997). "Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3." *J Biol Chem* **272**(41): 25706-12.
- Mannick, J. B., A. Hausladen, L. Liu, D. T. Hess, M. Zeng, Q. X. Miao, L. S. Kane, A. J. Gow and J. S. Stamler (1999). "Fas-induced caspase denitrosylation." *Science* **284**(5414): 651-4.
- Meinhardt, G., J. Roth and G. Totok (2000). "Protein kinase C activation modulates pro- and anti-apoptotic signaling pathways." *Eur J Cell Biol* **79**(11): 824-33.
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., Dimanche-Boitrel, M. T. (1999). "Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs." *J Biol Chem* **274**(12): 7987-92.
- Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand and M. G. Grutter (2002). "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* **277**(47): 45162-71.
- Migone, T. S., J. Zhang, X. Luo, L. Zhuang, C. Chen, B. Hu, J. S. Hong, J. W. Perry, S. F. Chen, J. X. Zhou, Y. H. Cho, S. Ullrich, P. Kanakaraj, J. Carrell, E. Boyd, H. S. Olsen, G. Hu, L. Pukac, D. Liu, J. Ni, S. Kim, R. Gentz, P. Feng, P. A. Moore, S. M. Ruben and P. Wei (2002). "TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator." *Immunity* **16**(3): 479-92.
- Milanini, J., F. Vinals, J. Pouyssegur and G. Pages (1998). "p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts." *J Biol Chem* **273**(29): 18165-72.
- Mitsiades, N., W. H. Yu, V. Poulaki, M. Tsokos and I. Stamenkovic (2001). "Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity." *Cancer Res* **61**(2): 577-81.
- Mizuno, K., K. Noda, T. Araki, T. Imaoka, Y. Kobayashi, Y. Akita, M. Shimonaka, S. Kishi and S. Ohno (1997). "The proteolytic cleavage of protein kinase C isotypes, which generates kinase and regulatory fragments, correlates with Fas-mediated and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced apoptosis." *Eur J Biochem* **250**(1): 7-18.
- Moenner, M., M. Gusse, E. Hatzi and J. Badet (1994). "The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis." *Eur J Biochem* **226**(2): 483-90.
- Moncada, S. and J. D. Erusalimsky (2002). "Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(3): 214-20.
- Moroni, M. C., E. S. Hickman, E. L. Denchi, G. Caprara, E. Colli, F. Cecconi, H. Muller and K. Helin (2001). "Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53." *Nat Cell Biol* **3**(6): 552-8.
- Morrison, C. J., G. S. Butler, H. F. Bigg, C. R. Roberts, P. D. Soloway and C. M. Overall (2001). "Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway." *J Biol Chem* **276**(50): 47402-10.
- Moustakas, A., K. Pardali, A. Gaal and C. H. Heldin (2002). "Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation." *Immunol Lett* **82**(1-2): 85-91.
- Murga, C., M. Zohar, H. Teramoto and J. S. Gutkind (2002). "Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB." *Oncogene* **21**(2): 207-16.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* **116**(2): 221-34.

- Muzio, M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen and V. M. Dixit (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem* **273**(5): 2926-30.
- Myohara, M. (2004). "Real-time observation of autophagic programmed cell death of *Drosophila* salivary glands in vitro." *Dev Genes Evol* **214**(2): 99-104.
- Nagata, S. and T. Suda (1995). "Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations." *Immunol Today* **16**(1): 39-43.
- Nagel-Wolfrum, K., C. Buerger, I. Wittig, K. Butz, F. Hoppe-Seyler and B. Groner (2004). "The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells." *Mol Cancer Res* **2**(3): 170-82.
- Newton, K., A. W. Harris, M. L. Bath, K. G. Smith and A. Strasser (1998). "A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes." *Embo J* **17**(3): 706-18.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." *Cell Death Differ* **6**(11): 1028-42.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* **139**(2): 271-9.
- Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H. C. Crawford, S. Vermeulen, W. Steelant, E. Bruyneel, L. M. Matrisian and M. Mareel (2001). "Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1." *J Cell Sci* **114**(Pt 1): 111-118.
- Nomura, K., H. Imai, T. Koumura, M. Arai and Y. Nakagawa (1999). "Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway." *J Biol Chem* **274**(41): 29294-302.
- O'Connor, D. S., D. Grossman, J. Plescia, F. Li, H. Zhang, A. Villa, S. Tognin, P. C. Marchisio and D. C. Altieri (2000). "Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13103-7.
- O'Connor, D. S., N. R. Wall, A. C. Porter and D. C. Altieri (2002). "A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer." *Cancer Cell* **2**(1): 43-54.
- Oehme, I., Neumann F., and Zörnig M. (2004). "Transgenic overexpression of the Caspase-8 inhibitor FLIP short leads to impaired T-cell proliferation and an increased memory T-cell pool after Staphylococcal enterotoxin B (SEB) injection." [manuscript in preparation](#).
- Olson, M. F., H. F. Paterson and C. J. Marshall (1998). "Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1." *Nature* **394**(6690): 295-9.
- Otto, W. R. and J. Rao (2004). "Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage." *Cell Prolif* **37**(1): 97-110.
- Pan, Y., H. Chen, F. Siu and M. S. Kilberg (2003). "Amino acid deprivation and endoplasmic reticulum stress induce expression of multiple activating transcription factor-3 mRNA species that, when overexpressed in HepG2 cells, modulate transcription by the human asparagine synthetase promoter." *J Biol Chem* **278**(40): 38402-12.
- Park, J. W., M. A. Jang, Y. H. Lee, A. Passaniti and T. K. Kwon (2001). "p53-independent elevation of p21 expression by PMA results from PKC-mediated mRNA stabilization." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(1): 244-8.
- Pelengaris, S., M. Khan and G. Evan (2002). "c-MYC: more than just a matter of life and death." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 764-76.
- Pi, X., C. Yan and B. C. Berk (2004). "Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis." *Circ Res* **94**(3): 362-9.
- Pines, J. (1999). "Cell cycle. Checkpoint on the nuclear frontier." *Nature* **397**(6715): 104-5.

- Pinheiro, N. A., Caballero OL, Soares F, Reis LF, Simpson AJ. (2001). "Significant overexpression of oligophrenin-1 in colorectal tumors detected by cDNA microarray analysis." Cancer Lett **172**(1): 67-73.
- Pitti, R. M., S. A. Marsters, D. A. Lawrence, M. Roy, F. C. Kischkel, P. Dowd, A. Huang, C. J. Donahue, S. W. Sherwood, D. T. Baldwin, P. J. Godowski, W. I. Wood, A. L. Gurney, K. J. Hillan, R. L. Cohen, A. D. Goddard, D. Botstein and A. Ashkenazi (1998). "Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer." Nature **396**(6712): 699-703.
- Price, J. T., T. Tiganis, A. Agarwal, D. Djakiew and E. W. Thompson (1999). "Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism." Cancer Res **59**(21): 5475-8.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King and A. Strasser (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." Mol Cell **3**(3): 287-96.
- Puthalakath, H., A. Villunger, L. A. O'Reilly, J. G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. Huang and A. Strasser (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." Science **293**(5536): 1829-32.
- Rao, L., D. Perez and E. White (1996). "Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1441-55.
- Reed, J. C. (1997). "Double identity for proteins of the Bcl-2 family." Nature **387**(6635): 773-6.
- Reed, J. C. and J. R. Bischoff (2000). "BIRinging chromosomes through cell division--and survivin' the experience." Cell **102**(5): 545-8.
- Rehemtulla, A., C. A. Hamilton, A. M. Chinnaiyan and V. M. Dixit (1997). "Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1)." J Biol Chem **272**(41): 25783-6.
- Rehner, G., H. Daniel (1999). "Biochemie der Ernährung." Spektrum Lehrbuch(1. Auflage): 148-149.
- Reyland, M. E., S. M. Anderson, A. A. Matassa, K. A. Barzen and D. O. Quissell (1999). "Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells." J Biol Chem **274**(27): 19115-23.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho GTPases and cell migration." J Cell Sci **114**(Pt 15): 2713-22.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-9.
- Rodriguez, J. and Y. Lazebnik (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." Genes Dev **13**(24): 3179-84.
- Rohn, J. L., Hueber, A. O., McCarthy, N. J., Lyon, D., Navarro, P., Burgering, B. M., Evan, G. I. (1998). "The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis." Oncogene **17**(22): 2811-8.
- Roth, W., S. Isenmann, M. Nakamura, M. Platten, W. Wick, P. Kleihues, M. Bahr, H. Ohgaki, A. Ashkenazi and M. Weller (2001). "Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis." Cancer Res **61**(6): 2759-65.
- Rytomaa, M., L. M. Martins and J. Downward (1999). "Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis." Curr Biol **9**(18): 1043-6.
- Saez, E., M. C. Nelson, B. Eshelman, E. Banayo, A. Koder, G. J. Cho and R. M. Evans (2000). "Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14512-7.
- Salmena, L., B. Lemmers, A. Hakem, E. Matysiak-Zablocki, K. Murakami, P. Y. Au, D. M. Berry, L. Tambllyn, A. Shehabeldin, E. Migon, A. Wakeham, D. Bouchard, W. C. Yeh, J. C. McGlade, P. S. Ohashi and R. Hakem (2003). "Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity." Genes Dev **17**(7): 883-95.
- Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 401-10.

- Savill, J. (1997). "Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis." *Br Med Bull* **53**(3): 491-508.
- Saxen, L. and H. Sariola (1987). "Early organogenesis of the kidney." *Pediatr Nephrol* **1**(3): 385-92.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer and M. E. Peter (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *Embo J* **17**(6): 1675-87.
- Scaffidi, C., P. H. Krammer and M. E. Peter (1999). "Isolation and analysis of components of CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex." *Methods* **17**(4): 287-91.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* **274**(3): 1541-8.
- Scaffidi, C., J. Volkland, I. Blomberg, I. Hoffmann, P. H. Krammer and M. E. Peter (2000). "Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase." *J Immunol* **164**(3): 1236-42.
- Schaller, M. D. (2001). "Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase." *Biochim Biophys Acta* **1540**(1): 1-21.
- Schmidt, M., Y. Lu, B. Liu, M. Fang, J. Mendelsohn and Z. Fan (2000). "Differential modulation of paclitaxel-mediated apoptosis by p21Waf1 and p27Kip1." *Oncogene* **19**(20): 2423-9.
- Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, E. Baranov, R. M. Hoffman and S. W. Lowe (2002). "Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo." *Cancer Cell* **1**(3): 289-98.
- Schneider, C. and G. Hubinger (2002). "Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family." *Leuk Lymphoma* **43**(7): 1355-66.
- Shapiro, R., J. F. Riordan and B. L. Vallee (1986). "Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin." *Biochemistry* **25**(12): 3527-32.
- Shibata, T., A. Ochiai, Y. Kanai, S. Akimoto, M. Gotoh, N. Yasui, R. Machinami and S. Hirohashi (1996). "Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells." *Oncogene* **13**(5): 883-9.
- Shimizu, S., Y. Matsuoka, Y. Shinohara, Y. Yoneda and Y. Tsujimoto (2001). "Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells." *J Cell Biol* **152**(2): 237-50.
- Shimoyama, Y. and S. Hirohashi (1991). "Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma." *Cancer Lett* **57**(2): 131-5.
- Slee, E. A., Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." *J Cell Biol* **144**(2): 281-92.
- Smiley, S. T., M. Reers, C. Mottola-Hartshorn, M. Lin, A. Chen, T. W. Smith, G. D. Steele, Jr. and L. B. Chen (1991). "Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3671-5.
- Song, W. J., Sternberg LR, Kasten-Sportes C, Keuren ML, Chung SH, Slack AC, Miller DE, Glover TW, Chiang PW, Lou L, Kurnit DM. (1996). "Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region"." *Genomics* **38**(3): 331-9.
- Sottile, J. (2004). "Regulation of angiogenesis by extracellular matrix." *Biochim Biophys Acta* **1654**(1): 13-22.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." *Mol Cell* **1**(7): 949-57.
- St Croix, B., V. A. Florenes, J. W. Rak, M. Flanagan, N. Bhattacharya, J. M. Slingerland and R. S. Kerbel (1996). "Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents." *Nat Med* **2**(11): 1204-10.

- Stanford, A., Y. Chen, X. R. Zhang, R. Hoffman, R. Zamora and H. R. Ford (2001). "Nitric oxide mediates dendritic cell apoptosis by downregulating inhibitors of apoptosis proteins and upregulating effector caspase activity." *Surgery* **130**(2): 326-32.
- Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (2000). "Caspase assays." *Methods Enzymol* **322**: 91-100.
- Stevens, C. and N. B. La Thangue (2003). "E2F and cell cycle control: a double-edged sword." *Arch Biochem Biophys* **412**(2): 157-69.
- Strasser, A., Newton, K. (1999). "FADD/MORT1, a signal transducer that can promote cell death or cell growth." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(5): 533-7.
- Streuli, C. (1999). "Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation." *Curr Opin Cell Biol* **11**(5): 634-40.
- Stroh, C. and K. Schulze-Osthoff (1998). "Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates." *Cell Death Differ* **5**(12): 997-1000.
- Su, T. T., B. Guo, Y. Kawakami, K. Sommer, K. Chae, L. A. Humphries, R. M. Kato, S. Kang, L. Patrone, R. Wall, M. Teitell, M. Leitges, T. Kawakami and D. J. Rawlings (2002). "PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling." *Nat Immunol* **3**(8): 780-6.
- Sulston, J. E., Horvitz H.R. (1977). "Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Dev. Biol.* **82**: 110-156.
- Supriatno, K. Harada, M. O. Hoque, T. Bando, H. Yoshida and M. Sato (2002). "Overexpression of p27(Kip1) induces growth arrest and apoptosis in an oral cancer cell line." *Oral Oncol* **38**(7): 730-6.
- Suzuki, A., Y. Tsutomi, K. Akahane, T. Araki and M. Miura (1998). "Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP." *Oncogene* **17**(8): 931-9.
- Suzuki, A., Y. Tsutomi, M. Miura and K. Akahane (1999). "Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21." *Oncogene* **18**(5): 1239-44.
- Suzuki, A., Y. Tsutomi, N. Yamamoto, T. Shibutani and K. Akahane (1999). "Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3842-7.
- Swanton, C. (2004). "Cell-cycle targeted therapies." *Lancet Oncol* **5**(1): 27-36.
- Sympton, C. J., R. S. Talhouk, C. M. Alexander, J. R. Chin, S. M. Clift, M. J. Bissell and Z. Werb (1994). "Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression." *J Cell Biol* **125**(3): 681-93.
- Tai, T.-S., Fang L-W and Lai M-Z (2004). "c-FLICE inhibitory protein expression inhibits T-cell activation." *Cell Death and Differentiation* **11**: 69-79.
- Takahama, Y., Y. Yamada, K. Emoto, H. Fujimoto, T. Takayama, M. Ueno, H. Uchida, S. Hirao, T. Mizuno and Y. Nakajima (2002). "The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas." *Gastric Cancer* **5**(2): 61-8.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." *Nat Immunol* **2**(2): 129-34.
- Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinel, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Kramer, M. E. Peter and J. Tschopp (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." *Nature* **386**(6624): 517-21.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." *Science* **267**(5203): 1456-62.
- Thornberry, N. A. (1997). "The caspase family of cysteine proteases." *Br Med Bull* **53**(3): 478-90.

- Tomida, M. and T. Saito (2004). "The human hepatocyte growth factor (HGF) gene is transcriptionally activated by leukemia inhibitory factor through the Stat binding element." *Oncogene* **23**(3): 679-86.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe and C. M. Croce (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." *Science* **228**(4706): 1440-3.
- Ugurel, S., G. Rappl, W. Tilgen and U. Reinhold (2001). "Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients." *Clin Cancer Res* **7**(5): 1282-6.
- Vairo, G., T. J. Soos, T. M. Upton, J. Zalvide, J. A. DeCaprio, M. E. Ewen, A. Koff and J. M. Adams (2000). "Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4745-53.
- Varadhachary, A. S., M. Edidin, A. M. Hanlon, M. E. Peter, P. H. Krammer and P. Salgame (2001). "Phosphatidylinositol 3'-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95." *J Immunol* **166**(11): 6564-9.
- Vaux, D. L. (1997). "CED-4--the third horseman of apoptosis." *Cell* **90**(3): 389-90.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* **102**(1): 43-53.
- Vermeulen, K., Z. N. Berneman and D. R. Van Bockstaele (2003). "Cell cycle and apoptosis." *Cell Prolif* **36**(3): 165-75.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers and F. van Roy (1991). "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role." *Cell* **66**(1): 107-19.
- Walczak, H., R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C. Schuh and D. H. Lynch (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* **5**(2): 157-63.
- Wall, N. R., D. S. O'Connor, J. Plescia, Y. Pommier and D. C. Altieri (2003). "Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis." *Cancer Res* **63**(1): 230-5.
- Wallach, D., E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. V. Goltsev, A. V. Kovalenko and M. P. Boldin (1999). "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." *Annu Rev Immunol* **17**: 331-67.
- Walsh, C. M., B. G. Wen, A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, V. M. Dixit and S. M. Hedrick (1998). "A role for FADD in T cell activation and development." *Immunity* **8**(4): 439-49.
- Wang, G., R. Miskimins and W. K. Miskimins (2000). "Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27(Kip1)." *Exp Cell Res* **254**(1): 64-71.
- Wang, H., S. S. Shen, A. H. Diwan, W. Zhang, G. N. Fuller and V. G. Prieto (2003). "Expression of insulin-like growth factor-binding protein 2 in melanocytic lesions." *J Cutan Pathol* **30**(10): 599-605.
- Wang, X., M. C. DeFrances, Y. Dai, P. Padiaditakis, C. Johnson, A. Bell, G. K. Michalopoulos and R. Zarnegar (2002). "A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met." *Mol Cell* **9**(2): 411-21.
- Watson, P. A., H. H. Hanauske-Abel, A. Flint and M. Lalande (1991). "Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at the G1-S phase border." *Cytometry* **12**(3): 242-6.
- Wei, H., R. Saladi, Y. Lu, Y. Wang, S. R. Palep, J. Moore, R. Phelps, E. Shyong and M. G. Lebwohl (2003). "Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology." *J Nutr* **133**(11 Suppl 1): 3811S-3819S.
- Weiner, A. M. and N. Maizels (1999). "A deadly double life." *Science* **284**(5411): 63-4.

- Welsh, C. F., K. Roovers, J. Villanueva, Y. Liu, M. A. Schwartz and R. K. Assoian (2001). "Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho." Nat Cell Biol **3**(11): 950-7.
- Whitehead, I. P., S. Campbell, K. L. Rossman and C. J. Der (1997). "Dbl family proteins." Biochim Biophys Acta **1332**(1): F1-23.
- Wilson, A. J., K. Byron and P. R. Gibson (1999). "Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro." Clin Sci (Lond) **97**(3): 385-90.
- Woo, M., R. Hakem, C. Furlonger, A. Hakem, G. S. Duncan, T. Sasaki, D. Bouchard, L. Lu, G. E. Wu, C. J. Paige and T. W. Mak (2003). "Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity." Nat Immunol **4**(10): 1016-22.
- Woods, Y. L., Rena G, Morrice N, Barthel A, Becker W, Guo S, Unterman TG, Cohen P. (2001). "The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site." Biochem J **355**(Pt 3): 597-607.
- Wu, Q., Kirschmeier P, Hockenberry T, Yang TY, Brassard DL, Wang L, McClanahan T, Black S, Rizzi G, Musco ML, Mirza A, Liu S. (2002). "Transcriptional regulation during p21WAF1/CIP1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells." J Biol Chem **277**(39): 36329-37.
- Wyllie, A. H. (1992). "Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview." Cancer Metastasis Rev **11**(2): 95-103.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.
- Yamada, K. M. and S. Even-Ram (2002). "Integrin regulation of growth factor receptors." Nat Cell Biol **4**(4): E75-6.
- Yamamoto, K., H. Ichijo and S. J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M." Mol Cell Biol **19**(12): 8469-78.
- Yamasaki, F. H., S., Yoshioka, H., Kajiwara, Y., Yahara, K., Sugiyama, K., Heike, Y., Arita, K., Kurisu, K. (2003). "Staurosporine-induced apoptosis is independent of p16 and p21 and achieved via arrest at G2/M and at G1 in U251MG human glioma cell line." Cancer Chemother Pharmacol **51**(4): 271-83.
- Yang, Q., T. Sakurai, G. Yoshimura, Y. Takashi, T. Suzuma, T. Tamaki, T. Umemura, Y. Nakamura, M. Nakamura, H. Utsunomiya, I. Mori and K. Kakudo (2000). "Overexpression of p27 protein in human breast cancer correlates with in vitro resistance to doxorubicin and mitomycin C." Anticancer Res **20**(6B): 4319-22.
- Yang, Z., D. K. Strickland and P. Bornstein (2001). "Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2." J Biol Chem **276**(11): 8403-8.
- Yen, A. and A. B. Pardee (1978). "Arrested states produced by isoleucine deprivation and their relationship to the low serum produced arrested state in Swiss 3T3 cells." Exp Cell Res **114**(2): 389-95.
- Yoshiura, K., Y. Kanai, A. Ochiai, Y. Shimoyama, T. Sugimura and S. Hirohashi (1995). "Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7416-9.
- Young, R. A. (2000). "Biomedical discovery with DNA arrays." Cell **102**(1): 9-15.
- Yu, W. H., J. F. Woessner, Jr., J. D. McNeish and I. Stamenkovic (2002). "CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling." Genes Dev **16**(3): 307-23.
- Yuan, J., Shaham S, Ledoux S, Ellis HM & Horvitz HR (1993). "The c. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1beta-converting enzyme." Cell **75**: 641-652.
- Zhang, C., C. Gao, J. Kawachi, Y. Hashimoto, N. Tsuchida and S. Kitajima (2002). "Transcriptional activation of the human stress-inducible transcriptional repressor ATF3 gene promoter by p53." Biochem Biophys Res Commun **297**(5): 1302-10.

- Zhang, F., M. Monkkonen, S. Roth and M. Laiho (2002). "TGF-beta induced G(1) cell cycle arrest requires the activity of the proteasome pathway. Transforming growth factor." *Exp Cell Res* **281**(2): 190-6.
- Zhang, J., D. Cado, A. Chen, N. H. Kabra and A. Winoto (1998). "Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1." *Nature* **392**(6673): 296-300.
- Zhang, X., L. Ma, S. A. Enkemann and W. J. Pledger (2003). "Role of Gadd45alpha in the density-dependent G1 arrest induced by p27(Kip1)." *Oncogene* **22**(27): 4166-74.
- Zheng, Y. (2001). "Dbl family guanine nucleotide exchange factors." *Trends Biochem Sci* **26**(12): 724-32.
- Zhou, B. B. and J. Bartek (2004). "Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection." *Nat Rev Cancer* **4**(3): 216-25.
- Zieve, G. W., D. Turnbull, J. M. Mullins and J. R. McIntosh (1980). "Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. Nocodazole accumulated mitotic cells." *Exp Cell Res* **126**(2): 397-405.
- Zornig, M. and G. I. Evan (1996). "Cell cycle: on target with Myc." *Curr Biol* **6**(12): 1553-6.
- Zornig, M., A. Hueber, W. Baum and G. Evan (2001). "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis." *Biochim Biophys Acta* **1551**(2): F1-37.
- Zornig, M., A. O. Hueber and G. Evan (1998). "p53-dependent impairment of T-cell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice." *Curr Biol* **8**(8): 467-70.
- Zou, H., Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X 1997: Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 (1997). " Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." *Cell* **90**(3): 405-13.

10 Anhang

Lebenslauf

Ina Oehme

Geboren am 25. März 1974 in Karlsruhe

1980-1984	Grundschule in Sasbachwalden, Baden-Württemberg
1984-1993	Gymnasium Achern, Baden-Württemberg
1993	Abitur
Okt.1993 – März 1994	Praktikum in der Krankenhausküche Kreiskrankenhaus Achern
1994 – 2000	Studium der Ökotrophologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen, Hessen
Nov. 1996	Vordiplom
Nov. 1997 – Mai 1999	Diplomarbeit im Bereich Biochemie der Ernährung (AG Daniel) mit dem Titel: „WIRKUNGEN VON FLAVONOIDEN AUF DIE DURCH HITZESTABILES E.COLI ENTEROTOXIN (STA) AUSGELÖSTE CHLORIDSEKRETION IN HUMANEN KOLONEPITHELZELLEN (HT29)“
Juli 1999 – Okt. 1999	Auslandspraktikum an der University of Alberta, Edmonton, Canada: Department of Agricultural, Food and Nutritional Science
April 2000	Diplom
Juli 2000	Beginn der Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Zörnig, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Groner in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Martin Zörnig angefertigt, wofür ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Groner bedanken möchte.

Herrn Prof. Dr. Volker Dötsch danke ich sehr für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Zörnig für die exzellente fachliche und persönliche Betreuung im Georg-Speyer-Haus. Sein für sämtliche Belange immer offenes Ohr und seine konstruktive Kritik habe ich sehr zu schätzen gelernt. Bedanken möchte ich mich auch dafür, dass er mir bei der Umsetzung meiner Ideen freie Hand gelassen hat.

Allen Kolleginnen und Kollegen der AG Zörnig sowie der anderen Arbeitsgruppen des Georg-Speyer-Hauses sei für die gute Zusammenarbeit und die hervorragende Arbeitsatmosphäre herzlich gedankt. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Susanne Bösser, Wiebke Baum, Sara Mateus Fernández, Tim Bläsner und Robert Pick für ihre Freundschaft, ihren Humor, ihre Dynamik und Kreativität. Zusätzlich möchte ich Susanne Bösser für ihr Koordinationstalent und für das „T in ihrer Berufsbezeichnung“ danken. Wiebke Baum möchte ich für die unverzichtbaren fachlichen Diskussionen sowie für die Abwechslung, die sie von Zeit zu Zeit in die ansonsten so eintönige tägliche Zugfahrt gebracht hat, danken. Sara Mateus Fernández danke ich für ein bisschen spanisches Flair in meinem Laboralltag sowie für ihre unterstützenden Worte. Tim Bläsner möchte ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Robert Pick bin ich sehr dankbar für seine charmante und aufbauende Art und dafür, dass er der beste „Bench“-Nachbar war, den frau (!) sich wünschen konnte.

Dr. Kirsten Völp, Dr. Vladimir Kirkin und Dr. Marie-Luise Brezniceanu danke ich für Gespräche, Tipps und praktische Hilfen, die im Laboralltag überaus wichtig waren.

Ganz besonders möchte ich den Menschen danken, die mich während der letzten Jahre unterstützt und manchmal auch ertragen haben: Petra Sackmann, Sonja Guber, Kathrin Tietze, Silke Schüle, Andrea Sackmann, Yenia Zaba, Sabine Kuntz und meinen Eltern.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt sowie mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den

.....
(Ina Oehme)