



**Entwicklung molekularer Testsysteme für die  
pharmazeutische Forschung: Inhibition des mitogenen  
Ras/Raf-Signalwegs und Validierung von PKB/Akt als potentielle  
Zielstruktur zur Therapie maligner Erkrankungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Sascha Hövelmann**  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2002)  
(DF1)

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1999 bis Dezember 2001 in den Labors der ASTA Medica AG, Abteilung Tumorforschung/Molekularbiologie in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie (Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt.

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. E. Müller  
1. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dingermann  
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Marschalek

Datum der Disputation: 23. Juli 2002

*Ein Tag ohne ein Lächeln ist ein verlorener Tag.*

*- Charlie Chaplin -*



# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1. Krebs – eine hyperproliferative Erkrankung	1
1.1.1. Mechanismen der Kanzerogenese	1
1.1.2. Therapeutische Implikationen	3
1.2. Etablierung eines <i>in vitro</i> Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf Interaktion	6
1.2.1. Mitogener Signalweg	6
1.2.2. Activin-Rezeptor Signalweg	10
1.2.3. Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen	12
1.3. Validierung von PKB/Akt als Zielprotein in der Tumorthapie	14
1.3.1. Apoptose und Apoptotische Signalwege	14
1.3.2. PKB/Akt	22
1.4. Ziele der Arbeit	30

## 2. Material

2.1. Geräte	31
2.2. Datenverarbeitung	32
2.3. Verbrauchsmaterialien	32
2.4. Chemikalien	32
2.5. Biochemikalien	34
2.5.1. Restriktionsendonukleasen	34
2.5.2. DNA-modifizierende Enzyme	34
2.5.3. Antikörper	34
2.5.4. Zellkulturmedien, Medienzusätze, Antibiotika, Liganden	37
2.5.5. Plasmide	38
2.5.6. Oligonukleotide	39
2.5.7. Kits	39

2.6. Biologisches Material	40
2.6.1. Bakterienstämme	40
2.6.2. Hefestämme	40
2.6.3. Säugerzelllinien	40

### 3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden	41
3.1.1. Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	41
3.1.2. Bestimmung der Transformationsrate chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	42
3.1.3. Transformation von Plasmid DNA in chemokompetente <i>E. coli</i> Zellen	42
3.1.4. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	43
3.1.5. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	43
3.1.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	44
3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten	44
3.1.8. „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)	44
3.1.9. Sequenzanalyse von DNA	45
3.1.10. Klonierung verschiedener Deletionsmutanten der $\beta$ -Galactosidase und der Fusionsproteine	46
3.1.11. Klonierung eines konstitutiv aktiven PKB/Akt-Derivats	49
3.2. Zellbiologische Methoden - Hefen	50
3.2.1. Verwendete Hefestämme	50
3.2.2. Stabile Hefetransformation von <i>Pichia Pastoris</i> mittels LiCl-Methode	50
3.2.3. Stabile Hefetransformation von <i>Pichia Pastoris</i> mittels Elektroporation	51
3.2.4. Proteinexpression der rekombinanten <i>Pichia Pastoris</i> Stämme	51
3.2.5. Aufschluss von Hefen mittels Glas bzw. Zirkonium Chlorid-Kügelchen	52
3.3. Zellbiologische Methoden - eukaryotische Zelllinien	52
3.3.1. Verwendete Zelllinien	52
3.3.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen	53
3.3.3. Subkultivierung von adhärennten Zellen	53
3.3.4. Zellzahlbestimmung	54
3.3.5. Bestimmung von Antibiotikumkonzentrationen für die Selektion stabil transfizierter Zellen	54
3.3.6. Stabile Transfektion von Säugerzellen mittels Fugene 6 <sup>®</sup>	55

3.3.7. Analyse der Proliferation durch Zellzahlbestimmung	55
3.3.8. XTT-Test auf Dehydrogenase-Aktivität	55
3.3.9. Analyse des Aktivierungsstatus von Akt/PKB in Tumorzellen	56
<b>3.4. Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>57</b>
3.4.1. Periplasma-Präparation von LB-Kulturen	57
3.4.2. Nickel-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aus <i>E. coli</i>	57
3.4.3. Renaturierung gereinigter rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	58
3.4.4. Native Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	59
3.4.5. Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen (Bichinchonic Acid)	60
3.4.6. Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen (BioRad)	60
3.4.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
3.4.8. Immunoblot	62
3.4.9. Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	63
3.4.10. Untersuchung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität	63
3.4.11. Untersuchung der Kinaseaktivität von PKB/Akt	64
3.4.12. PKB/Akt phospho-Substrate ELISA	64
3.4.13. Immunpräzipitation und Kinaseaktivitätstest der Focal Adhesion Kinase	65
3.4.14. Apoptose ELISA	66
3.4.15. Colorimetrischer Caspase 3 Aktivitätstest	66
3.4.16. Colorimetrischer Caspase 8 Aktivitätstest	67
3.4.17. Colorimetrischer Caspase 9 Aktivitätstest	68
3.4.18. Cytochrom C Fraktionierung und Quantifizierung mittels ELISA	68
3.4.19. FACS Analyse	69

## 4. Ergebnisse

4.1. Etablierung eines <i>in vitro</i> Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf Interaktion	70
4.1.1. Prinzip des Testsystems	70
4.1.2. Expressionssystem <i>Pichia Pastoris</i>	71
4.1.3. Expressionssystem <i>E. coli</i> ER2507	74

---

4.2. Validierung von PKB/Akt als Zielprotein in der Tumorthherapie	83
4.2.1. Etablierung genetisch veränderter Zelllinien, die konstitutiv aktives PKB/Akt exprimieren	83
4.2.2. Expression von konstitutiv aktivem PKB/Akt verhindert Anoikis in MCF10A Zellen	88
4.2.3. Vermittlung von Chemoresistenz durch Expression von konstitutiv aktivem PKB/Akt	92
4.2.4. Mechanistische Charakterisierung der Chemoresistenz in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen	94
4.2.5. Etablierung eines <i>in vivo</i> -Tumormodells	112
4.2.6. Besitzt PKB/Akt eine pro-apoptotische Wirkung ?	115
<b>5. Diskussion</b>	
5.1. Etablierung eines <i>in vitro</i> Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf-Interaktion	119
5.2. Validierung von PKB/Akt als Zielprotein in der Tumorthherapie	122
5.2.1. Charakterisierung genetisch veränderter Zelllinien, die konstitutiv aktives PKB/Akt exprimieren	122
5.2.2. PKB/Akt - ein zentraler Mediator bei der Verhinderung von Anoikis	125
5.2.3. PKB/Akt vermittelt Chemoresistenz <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	127
5.2.4. Mechanismen PKB/Akt-vermittelter Chemoresistenz	128
5.2.5. Besitzt PKB/Akt eine pro-apoptotische Funktion ?	133
5.2.6. PKB/Akt als potentielle Zielstruktur für anti-tumorale Strategien	134
<b>6. Zusammenfassung</b>	136
<b>7. Literatur</b>	138

## Abkürzungen

Activin-1B-R	Activin-1B-Rezeptor
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIF	apoptosis inducing factor
AIP	apoptosis inducing protein
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
APC	adenomatous polyposis coli
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated kinase
ATR	ataxia telangiectasia and rad3-related kinase
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CAK2	casein kinase 2
CARD	Caspase recruitment domain
CDK	Cyklin-abhängigen Kinase
CHK2	checkpoint kinase 2
CIP	calf intestine phosphatase
CREB	cAMP-response element binding protein
DD	death domain
DFF	DNA fragmentation factor
DHFR	dehydrofolat reduktase
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DTT	Dithiothreitol
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat - Dinatriumsalz
EGF	epidermal growth factor
eNOS	endotheliale NO Synthase
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
et al.	et altera (und andere)
EtOH	Ethanol
FADD	Fas associated death domain
FAK	focal adhesion kinase
Fas-L	Fas-Ligand
Fas-R	Fas-Rezeptor
FACS	fluorescent activated cell sorter
FCS <sub>i</sub>	fetal calf serum - inaktiviert
FKBP12	FK506 Bindeprotein 12
cFLIP	Flice inhibitory protein
5-FU	5'-Fluoruracil
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMRP	Guanine Nucleotide Release Protein

GSK3	Glykogen Synthetase Kinase 3
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
g	Gramm
h	Stunde(n)
HIPK2	homeodomain-interacting protein kinase-2
HS <sub>i</sub>	horse serum - inaktiviert
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IAP	Inhibitoren der Apoptose
IGF	Insulin-like growth factor
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGF-BP3	IGF binding protein 3
IκB	inhibitor of NF-κB
IKK	IκB kinase
ILK	integrin-linked kinase
IP <sub>3</sub>	Inositol - 1, 4, 5 - triphosphat
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
PI <sub>3</sub> -K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidyl-Inositol-(1,4,5)-triphosphat
M	molar (Mol pro Liter)
MAP-Kinase	mitogen activated protein Kinase
MDM2	murine double minute 2
MDR	multi-drug resistance protein
MEK	MAP or Erk kinase
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
mV	Millivolt
NF-κB	nuclear factor of IgK locus in B cells
ng	Nanogramm
NIK	NF-κB-inducing kinase
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
p53AIP1	p53-abhängiges Apoptose-induzierendes Protein 1
PARP	Poly ADP-Ribose) Polymerase
PBS	phosphate buffer saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDK1	IP <sub>3</sub> -dependent protein kinase-1
PFC	Proteinfragment Komplementationsassay
PH-Domäne	pleckstrin homology Domäne
PKB/Akt	Protein Kinase B/Akt
PKC	Protein Kinase C
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidyl-Inositol-(1,4,5)-triphosphat
pM	pikomolar

---

pmol/min	Pikomol pro Minute
PMS	N-Methyl-dibenzopyrazin-methylsulfat
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
rlu	relative light units (relative Lichteinheiten)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SOS	son of sevenless
TE	Tris-EDTA
Thr	Threonin
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TGF- $\beta$ -R	transforming growth factor beta receptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNF $\alpha$ -R	Tumor Nekrose Faktor alpha Rezeptor
TRADD	TNF-R I associated death domain
TRAF	TNF-R associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
U	units
u.a.	unter anderem
unb.	unbehandelt
ÜNRK	Übernacht-Rollerkultur
UPA	universal protein array
UV	ultraviolett
v:v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
WF	Wachstumsfaktoren
w:v	Gewicht pro Volumen
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	mikromolar

## **Danksagung**

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Dingermann und Herrn Dr. T. Beckers für die freundliche Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes in der Abteilung Tumorforschung/Molekularbiologie der ASTA Medica AG sowie für die gute Kooperation zwischen dem Institut für pharmazeutische Biologie und der ASTA Medica AG danken, die diese Promotionsarbeit erst möglich gemacht hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. M. Schmidt, der mit seiner fachlichen aber besonders auch menschlichen Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen hat. Darüber hinaus möchte ich ihm für die anregende und kritische Durchsicht dieser Promotionsarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. R. Marschalek danke ich für viele produktive Diskussionen und Anregungen innerhalb und außerhalb des Institutsseminars sowie für seine Bereitschaft, diese Promotionsarbeit zu begutachten.

Bei Frau S. Falk und Frau S. Moka möchte ich mich für die stete Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken. Herrn E. Thoenes und Frau Dr. C. Wallrapp gilt mein Dank insbesondere für ihre abendliche Gesellschaft im Labor und im Büro. Darüber hinaus ein Dankeschön an alle namentlich nicht erwähnten Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Tumorforschung/Molekularbiologie für die gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin danke ich meinen Eltern für ihren Zuspruch und ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Last but definitely not least ein großes herzliches Dankeschön an Sandra für Verständnis, Unterstützung und Aufmunterung. You put a smile on my face everyday...



# 1. Einleitung

## 1.1. Krebs – eine hyperproliferative Erkrankung

### 1.1.1. Mechanismen der Kanzerogenese

Ein genau reguliertes Zusammenspiel zwischen Proliferation, Differenzierung und Zellerneuerung ist die Voraussetzung für die Homöostase in vielzelligen Organismen. Ein Verlust dieser genauen Regulation führt fast unvermeidlich zum Ausbruch hyperproliferativer Erkrankungen wie beispielsweise Krebs oder zu Erkrankungen, die mit massiver Gewebs- oder Organzerstörung einhergehen, wie z.B. rheumatoide Arthritis oder anderen Autoimmunerkrankungen.

Neben einer Reihe umweltbedingter Faktoren wie z.B. Zigarettenrauch, UV-Licht-Exposition, ionisierende Strahlung, verschiedener Hormone und einiger Nahrungsmitteladditive [1] wird einigen Viren und Mikroorganismen eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung von Tumoren zugewiesen. HIV infizierte Patienten besitzen ein hohes Risiko, an Karposi-Sarkomen oder B-Zelllymphomen zu erkranken [2]. Eine kausale Verknüpfung besteht ebenfalls zwischen der Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus und dem Auftreten von Burkitt's-Lymphomen sowie der Ansteckung mit dem Hepatitis B Virus und der Entwicklung hepatischer Karzinome [2, 3]. In Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinalbereichs konnte oftmals eine Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* detektiert werden [4]. Desweiteren zeigt sich für bestimmte Krebsarten eine familiär erhöhte Inzidenz, was auf eine genetische Prädisposition für das Auftreten einer bestimmten Tumor-auslösenden Mutation hindeutet. Bekannte Beispiele hierfür sind Mutationen in den Genen BRCA 1 und BRCA 2 in Familien mit erhöhtem Brustkrebsrisiko und in den Genen DCC, FAP oder APC in Familien mit einer Veranlagung für das Auftreten von Kolonkarzinomen [5-7].

Die maligne Transformation einer Zelle ist das Ergebnis einer sukzessiven Akkumulation von genetischen Defekten, zu denen unter anderem die Aktivierung von Proto-Onkogenen, die Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen sowie die Induktion invasiver Eigenschaften gehören. Dieser mehrstufige Prozess beinhaltet das Auftreten verschiedener Mutationen, Gen-Amplifikationen und chromosomaler Translokationen innerhalb einer Zelle [8]. Molekulare Alterationen betreffen vor allem Gene, die in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden involviert sind, die zur Zellzykluskontrolle beitragen und die Tumordinvasivität und Tumormunität steuern. Im Verlauf der Tumorgenese in einer Zelle werden sie unabhängig voneinander akquiriert [9]. Der transformierte Phänotyp einer Tumorzelle ist in seinem

finalen Stadium dadurch charakterisiert, dass die Zellproliferation völlig dereguliert ist, Zell-Zell-Wechselwirkungen und die zelluläre Morphologie stark verändert sind, sich Zellen unkontrolliert teilen können und darüber hinaus in der Lage sind, sich aus dem Gewebeverband zu lösen, um in andere Gewebe zur Bildung von Metastasen einzuwandern [9]. Das Wachstum von Tumorzellen hängt fundamental von verstärkten Proliferations-signalen ab, mit Hilfe derer sich Tumorzellen Wachstumsvorteile gegenüber anderen Zellen verschaffen. Die Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. Her-2 ist ein bekanntes Beispiel wie sich Tumorzellen auf molekularer Ebene solche Wachstumsvorteile verschaffen [10]. Ras und Raf als integrale Bestandteile des MAP-Kinase Signalwegs sind zwei weitere Beispiele für Proto-Onkogene der mitogenen Signaltransduktion [11].

### **Krebs und Apoptose**

Im Laufe der malignen Transformation müssen Tumorzellen unter Bedingungen niedriger Sauerstoff- und Nährstoffversorgung überleben. Solche Bedingungen führen in normalen Geweben zur Induktion von Apoptose, um veränderte und damit für den Organismus potentiell gefährliche Zellen zu eliminieren. Tumorzellen müssen daher molekulare Mechanismen entwickeln, um diesen apoptotischen Stimuli entgegenzuwirken, damit sie unter solchen Bedingungen wachsen und solide Tumore bilden können. Als erstes Proto-Onkogen, das nicht-proliferative Signalwege modifiziert sondern Überleben der Zelle durch Blockade von Apoptose vermittelt, wurde Bcl-2 aus einer humanen Leukämie Zelllinie isoliert [12]. Mittlerweile konnten der Bcl-2-Familie 15 Proteine zugeordnet werden. Einige dieser Proteine können nach Insertion in die mitochondriale Membran Apoptose verhindern (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) oder auch auslösen (z.B. Bax, Bcl-x<sub>S</sub>). Bei der Analyse von Primärtumoren zeigte sich, dass in einigen Tumortypen die beiden anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> stärker exprimiert werden und somit das Auftreten von Apoptose verhindert wird. Für verschiedene Formen von Kolonkarzinomen und hematopoetischen Entartungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch die Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bax ein möglicher Mechanismus der Verhinderung von Apoptose ist [12].

Als erstes Tumorsuppressorgen wurde p53 mit Apoptose in Verbindung gebracht. Mutationen im p53-Gen konnten in einer Reihe humaner Tumore detektiert werden und gehen meist mit einer sehr schlechten Prognose und schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie beim Patienten einher. Neben seiner Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus und der Erhaltung der genomischen Integrität nach DNA-Schäden induziert p53 unter bestimmten Bedingungen (z.B. bei zu starker genotoxischer Schädigung) auch Apoptose [12]. Mutationen im p53-Gen stellen also einen weiteren Mechanismus der Verhinderung von Apoptose dar. Darüber hinaus

konnten Mutationen in weiteren Tumor-relevanten Genen nachgewiesen werden, die ebenfalls das Auftreten von Apoptose unterdrücken. So wurden Veränderungen im Expressionsmuster des Fas/CD95-Rezeptors entdeckt, die zur Entartung von Zellen des Immunsystems führen [12]. Der  $PI_3$ -Kinase-abhängige Signaltransduktionsweg ist ein weiterer wichtiger Mediator zur Vermittlung zellulären Überlebens und zur Regulation von Apoptose. Die Protein/Lipidphosphatase PTEN wurde als Tumorsuppressorgen identifiziert und ist als Gegenspieler der  $PI_3$ -Kinase in einer Reihe von Tumoren mutiert und/oder deletiert, was unter anderem zu einer verstärkten Aktivierung der anti-apoptotisch wirksamen PKB/Akt-Kinase führt [13, 14]. Insgesamt verdeutlichen diese Entdeckungen, dass die Mechanismen, die den programmierten Zelltod unterbinden, ebenso wichtig für die Entstehung onkologischer Erkrankungen sind wie die Aktivierung von Wachstumssignalkaskaden.

### 1.1.2. Therapeutische Implikationen

Neben der operativen Entfernung (sofern möglich) und der Bestrahlung des Tumors stellt die Chemotherapie eine wichtige und in vielen Fällen erfolgreiche therapeutische Option für den Tumorpatienten dar. Sowohl Bestrahlungs- als auch Chemotherapie weisen erhebliche Nebenwirkungen für den Patienten auf und sind wenig selektiv bzw. spezifisch. Bei operativer Entfernung des kompletten Tumors aber auch bei Bestrahlung des Tumors müssen oftmals schwere Schädigungen an gesundem Gewebe hingenommen werden. Praktisch alle etablierten Chemotherapeutika üben ihre zytotoxische Wirkung bevorzugt auf proliferierende Zellen über die Induktion von Apoptose aus, unabhängig von ihrem eigentlichen Wirkmechanismus oder der molekularen Zielstruktur [15]. Neben der erwünschten Wirkung an proliferierenden Tumorzellen weisen alle Zytostatika mehr oder weniger starke Nebenwirkungen an sich ständig regenerierenden Geweben wie z.B. dem blutbildenden Gewebe (Leuko- bzw. Thrombopenien), der Knochenhaut (Aplasie), der intestinalen Schleimhaut (Mukositis) und den Haarzellen (Alopezie) auf. Zudem kann es zur Schädigung von Eliminationsorganen (Leber, Niere) und zu charakteristischen Substanzklasse-spezifischen Nebenwirkungen wie z.B. Neuropathie durch Vinca-Alkaloide und andere Spindelgifte, Herzinsuffizienz durch Anthracycline oder Ototoxizität von Platinderivaten kommen [15].

Die Art der Behandlung ist abhängig von Typus und Größe des Tumors, der Krankheitsprogression und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten. Bei Patienten mit besonders schlechter Prognose wird oftmals auf eine sehr aggressive Therapie verzichtet, um zumindest die Lebensqualität des Patienten nicht noch weiter einzuschränken. Allgemein muss zwischen adjuvanter und palliativer Therapie unterschieden werden. Die adjuvante

Therapie hat eine vollständige Heilung und somit die Abtötung aller entarteter Zellen zum Ziel und ist beispielsweise bei kindlichen Tumoren, Lymphomen, akuten lymphatischen Leukämien, Morbus Hodgkin, Hodentumoren sowie seit einiger Zeit auch bei Osteosarkomen möglich [15]. Das Behandlungsziel der palliativen Therapie besteht in der Linderung der Beschwerden, der Lebensverlängerung und/oder der Verbesserung der Lebensqualität. Bei der Mehrzahl der soliden Tumore, z.B. Bronchial-, Pankreas-, Mamma- oder Ovarialkarzinomen, ist der therapeutische Erfolg häufig sehr unbefriedigend und klinisch kann oft lediglich eine längerfristige Remission erzielt werden. Die unvollständig entfernte Tumormasse kann sich erneut vermehren und zum Rezidiv führen [15]. Bei der Kombination von Chemotherapie mit Bestrahlung bzw. Operation wird zwischen adjuvanter und neo-adjuvanter Chemotherapie unterschieden. Bei der adjuvanten Chemotherapie werden Zytostatika im Anschluss an eine Operation oder Bestrahlung zur Behandlung von Mikrometastasen und Tumorresten gegeben. Die neo-adjuvante Chemotherapie dient zur Schädigung des Tumors und seiner Verkleinerung vor der Operation bzw. Bestrahlung.

Chemotherapeutika können in Abhängigkeit von ihrem Wirkmechanismus klassifiziert werden. Alkylierende Zytostatika wie Melphalan, Ifosphamid oder Cyclophosphamid wirken Zellzyklus-unabhängig vor allem durch Alkylierung von Nucleinsäuren. Nach ihrer metabolischen Aktivierung zu Carbokationen quervernetzen sie u.a. DNA-Stränge und verhindern so die Replikation und Transkription. Einen ähnlichen Mechanismus weisen Platinderivate wie Cis Platin oder Carboplatin auf, die intrazellulär einen elektrophilen Aquo-Komplex bilden und dann ebenfalls DNA-Stränge vernetzen können. Antimetaboliten wie 5-Fluorouracil verdrängen natürliche Stoffwechselbausteine und werden in DNA (pulsatile Gabe) oder RNA (kontinuierliche Gabe) inkorporiert, wodurch Stoffwechsel und Zellteilung gestört werden. Natürlich vorkommende Antibiotika wie Mitoxantron oder das Anthracyclin Doxorubicin interkalieren in die DNA, verhindern somit die Transkription und sorgen für DNA-Strangbrüche. Bereits vor Interkalation in die DNA hemmen diese beiden Substanzen in niedrigen Konzentrationen ähnlich wie Etoposid das Enzym Topoisomerase II, was ebenfalls zu DNA-Strangbrüchen führt. Eine weitere Klasse der Topoisomerase I Hemmstoffe bilden die Derivate des Alkaloids Camptothecin. Pflanzenalkaloide wie Vincristin oder Paclitaxel (Taxol) blockieren das Fortschreiten des Zellzyklus und der Mitose, indem sie die Mikrotubuli des Spindelapparates destabilisieren (Vincristin) bzw. übermäßig stabilisieren (Taxol) [15].

Etwa 60% aller chemotherapeutisch behandelten Tumore weisen bereits eine intrinsische Chemoresistenz auf, während 40% der Tumore Chemoresistenz im Laufe einer Therapie

akquirieren. Falls nach einer chirurgischen Entfernung noch Resttumormasse im Körper verbleibt, stellt die Chemoresistenz das größte Hindernis in der erfolgreichen Tumorbehandlung für den Patienten dar. Obwohl bereits einige Mechanismen, die zu Chemoresistenz führen, molekularbiologisch beschrieben sind, werden nur wenige dieser Mechanismen auch tatsächlich in der Klinik beobachtet [16]. Neben der Überexpression des MDR („Multi-Drug-Resistance“) Transportergens und der enzymatischen Inaktivierung des Zytostatikums (z.B. durch Glutathion-S-Transferasen) ist die Unterdrückung apoptotischer Stimuli der meist verbreitete Mechanismus, mit Hilfe dessen sich Tumorzellen der zytotoxischen Wirkung von Standard-Chemotherapeutika entziehen [17, 12]. Hierbei zeigen sich deutliche Zusammenhänge zwischen den genetischen Alterationen innerhalb einer Krebszelle und der Resistenz-Bildung. So aktivieren viele Agentien beispielsweise p53. Ein Verlust von funktionalem p53 durch Mutationen oder Deletionen - wie in vielen Tumorzellen zu beobachten - erschwert daher massiv die therapeutische Wirkung von p53-aktivierenden Substanzen [12]. Neben der Resistenzbildung durch erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und Desensitivierung durch verringerte Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax wurde in chemoresistenten Zellen die verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der zelluläre Überlebenssignale vermittelt, beobachtet [12]. Auch eine stärkere Aktivierung des PI<sub>3</sub>-Kinase-Signalwegs und die damit einhergehende erhöhte Aktivität der anti-apoptotisch wirksamen Kinase PKB/Akt wurde als Mechanismus zur Ausbildung von Chemoresistenz beschrieben [18, 19]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass die Wiederherstellung apoptotischer Wirkmechanismen oder die Unterdrückung anti-apoptotischer Signalwege zusammen mit dem Einsatz konventioneller Chemotherapie den therapeutischen Nutzen für den Patienten signifikant verbessern könnte. Seit einigen Jahren besteht in der Tumorthherapie die Tendenz, das gewachsene mechanistische Verständnis zu nutzen, um Zielmolekül-orientiert wirkende Substanzen zu identifizieren, die selektiv in bestimmte Signalwege eingreifen [153]. Dabei wird davon ausgegangen, dass potente und spezifische Inhibitoren dieser Zielmoleküle als Einzelkomponenten nicht unbedingt eine zytostatische oder zytotoxische Aktivität aufweisen. Allein in Kombination mit konventioneller Chemotherapie können solche Inhibitoren ihr therapeutisches Potential entfalten, indem sie beispielsweise Wachstumssignale unterdrücken oder Tumorzellen gegenüber apoptotischen Stimuli hervorgerufen durch Chemotherapeutika resensitivieren und somit zu einer effizienten Tumorregression führen [153]. Eine Steigerung der therapeutischen Effizienz ließe sich somit nicht allein durch Erhöhung der Dosis auf toxische Konzentrationen erreichen, sondern die selbe therapeutische Wirksamkeit könnte

durch Verabreichung niedrigerer Dosen Chemotherapeutika bewirkt und damit die ungewünschten Nebenwirkungen auf normale Gewebe oder Zellen reduziert werden.

## **1.2. Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf Interaktion**

Der erste Teil dieser Promotionsarbeit umfasste die Etablierung eines Testsystems zur Wirkstofffindung spezifischer Inhibitoren der Ras-Raf-Interaktion. In einer Vielzahl maligner Transformationen spielt die Deregulation der Ras-Signalkaskade eine bedeutende Rolle, wobei der Protein-Protein-Interaktion zwischen Ras und Raf eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung dieses mitogenen Signalwegs zukommt [20, 37]. Mit Sulindac Sulfid konnte bereits eine Substanz gefunden werden, die u.a. als Inhibitor dieser Protein-Protein-Interaktion fungiert und somit potentiell die Ras-induzierte Transformation von Tumorzellen verhindern kann [43, 161]. Zur Validierung des Testsystems wurde das Proteinpaar Activin-1B-R/FKBP12 ausgewählt, da es sich zum einen um eine sehr starke, gut charakterisierte Protein-Protein-Interaktion handelt und zum anderen mit FK506 ein spezifischer Inhibitor dieser Interaktion existiert. Mit Hilfe dieses Interaktionspaares sollte die Spezifität der  $\beta$ -Galactosidase-Komplementation überprüft und so die Funktionalität des Systems bestätigt werden.

### **1.2.1. Mitogener Signalweg**

Ein entscheidender Schritt der Tumorgenese liegt darin, dass Krebszellen in der Lage sind, übermäßig stark zu proliferieren und sich somit Wachstumsvorteile gegenüber nicht-transformierten Zellen verschaffen. Bei der Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung spielen mitogene Signalwege eine entscheidende Rolle [20, 21]. Eine Vielzahl von Genen, die der Vermittlung und Regulation von Wachstumssignalen dienen, konnten als Proto-Onkogene identifiziert werden [21-23]. Eine der am besten untersuchten proliferativen Signaltransduktionskaskaden ist der sogenannte MAP-Kinase Signalweg, der in Abbildung 1-1 dargestellt ist [24, 25].

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) - wie beispielsweise der EGF- oder PDGF-Rezeptor - dimerisieren nach Ligandenbindung und werden infolgedessen an spezifischen Tyrosin-Resten autophosphoryliert. An die neu generierten Phospho-Tyrosin-Reste der RTKs lagern sich nun die Adaptermoleküle Shc, GRB2 sowie SOS an und sorgen so für die Rekrutierung des Proto-Onkogens Ras an die Zellmembran. Die Verankerung des Ras-Proteins in der

Membran erfolgt durch den kovalent verknüpften Prenyl-Rest. Ras ist eine monomere GTPase, die im GTP-gebundenen Zustand aktiv und im GTP-ungebundenen Zustand inaktiv ist [26].

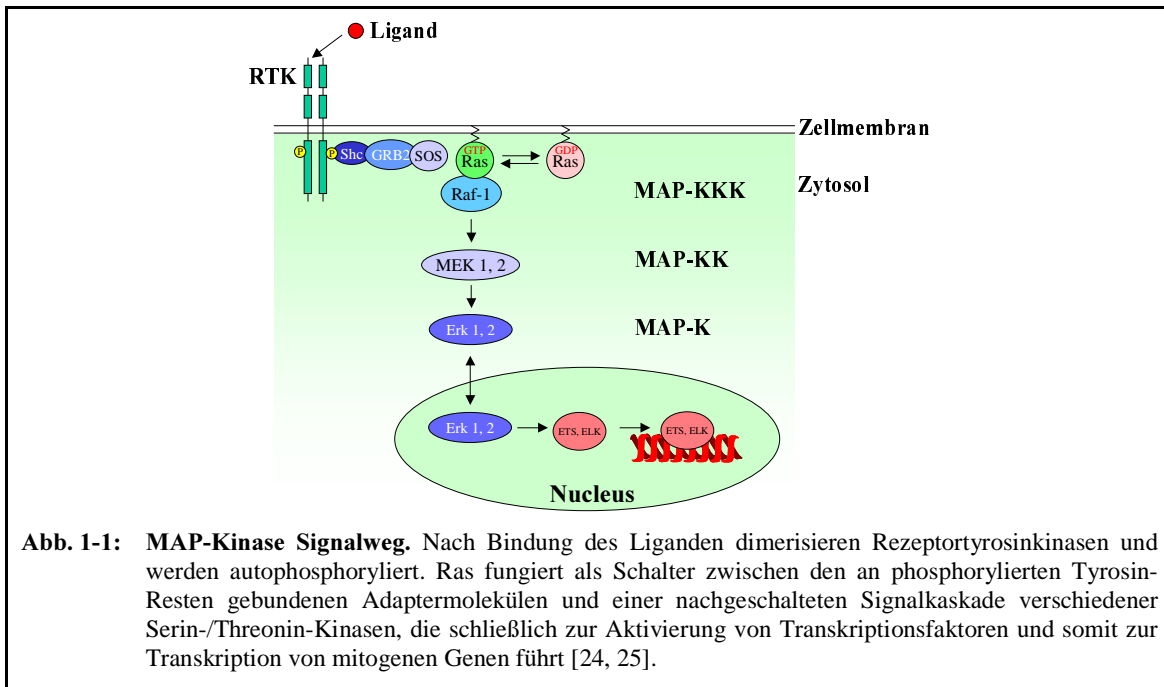
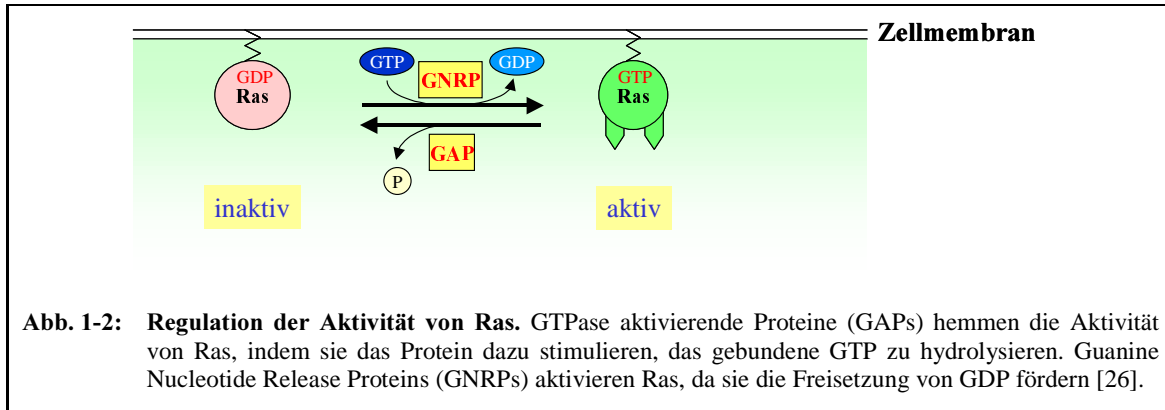


Abbildung 1-2 zeigt die Regulation der Aktivität von Ras. Unter Vermittlung von sogenannten „Guanine Nucleotide Release Proteins“ (GNRPs) wird Ras durch den Austausch von GTP zu GDP aktiviert. Die Hydrolyse des GTP wird durch „GTPase aktivierende Proteine“ (GAPs) vermittelt, wobei Ras erneut in seinen inaktiven Zustand übergeht. Durch die GTP-Bindung kommt es zu einer starken Konformationsänderung, wodurch Ras mit seinen nachgeschalteten Interaktionspartnern wechselwirken kann [26]. Die Signalweiterleitung erfolgt über eine Kaskade verschiedener Serin-/Threonin-Kinasen. Die Kinase Raf-1 wird durch Interaktion mit Ras aktiviert und phosphoryliert MEK-1 oder MEK-2 Kinase, die nun ihrerseits ERK-1 bzw. ERK-2 sowohl an Serin-/Threonin- als auch Tyrosin-Resten phosphoryliert. Phosphorylierte ERK Kinase kann in den Zellkern translozieren und dort ihre Zielproteine, z.B. den Transkriptionsfaktor Elk-1, phosphorylieren und die Transkription von Genen aktivieren [24].

Bei der Interaktion von Ras und Raf handelt es sich um den zentralen Schalter zwischen einem kurzfristigen Signal, das durch Tyrosin-Phosphorylierung des Wachstumsfaktorrezeptors und anschließender Aktivierung von Ras hervorgerufen wird und einer nachgeschalteten Signalkaskade, die über länger anhaltende Serin-/Threonin-Phosphorylierung die Transkription von Genen aktiviert. Nach ihrer Entdeckung wurde dieser Protein-

Protein-Interaktion schnell eine bedeutende Rolle in der zellulären Transformation zugewiesen [27-30]. Mittlerweile wurden drei humane Ras Gene (H-, N- und K- Ras) identifiziert, die jeweils für eine 21kDa GTPase von 188-189 Aminosäuren kodieren [25]. Durch die Mutationen der Aminosäuren 12, 13 bzw. 61 entstehen Ras-Proteine mit stark transformierendem Potential, da diese Proteine nur sehr eingeschränkt in der Lage sind, GTP wieder zu GDP zu hydrolysieren und somit stets in ihrer aktivierten Konformation vorliegen [25].

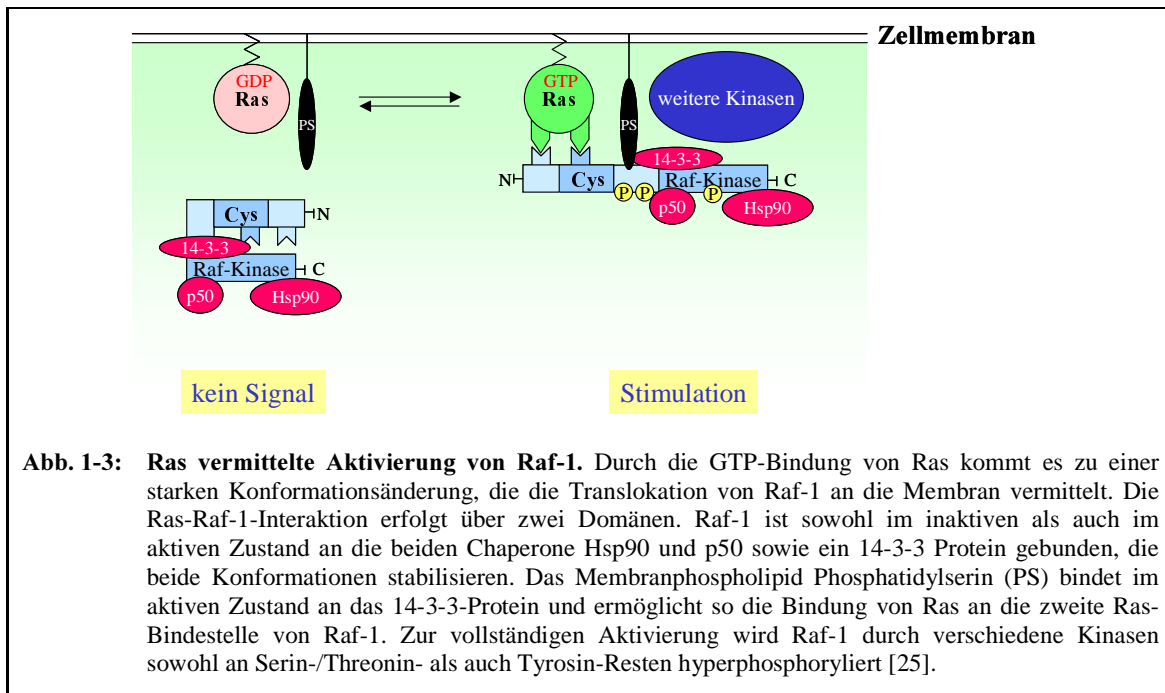


Raf-1 ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die aus zwei funktionalen Domänen besteht: Die N-terminale regulatorische Domäne unterdrückt die Funktion der C-terminalen Kinase Domäne [31]. Die Aktivität von Raf-1 wird zum einen durch Hyperphosphorylierung gesteuert, zum anderen weist Raf-1 sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand eine starke Interaktion mit 14-3-3-Proteinen auf [25, 31]. Im inaktiven Zustand verdecken diese eine Ras-Bindestelle und stabilisieren so die inaktive Konformation. Nach Hyperphosphorylierung können 14-3-3 Proteine aber auch die aktive Form von Raf-1 stabilisieren und die Inaktivierung von Raf-1 durch Phosphatasen verhindern [30-32]. Die Stabilität und die korrekte Lokalisation von Raf-1 wird durch eine sehr feste Assoziation mit den Chaperonen Hsp90 und p50 vermittelt [31]. Bis jetzt konnten drei verschiedene Isoenzyme von Raf - Raf-1, A-Raf und B-Raf - gefunden werden, die in verschiedenen Organen unterschiedlich stark exprimiert werden [33]. Sie besitzen eine gemeinsame, hoch konservierte Struktur der regulatorischen und der Kinase-Domäne, unterscheiden sich jedoch in ihrem zur Aktivierung notwendigen Phosphorylierungsmuster und ihrer Ras-Bindungsaffinität [33].

Entscheidend für die Aktivierung von Raf-1 ist die direkte Interaktion mit Ras, wie sie in Abbildung 1-3 dargestellt ist. Hierbei handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, wobei die Aktivierung durch direkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen verschiedenen Ras-Domänen mit zwei Raf-1-Domänen erfolgt [34, 35]. Die Membranassoziation von Raf-1 wird durch Wechselwirkung von Ras mit der ersten Ras-Bindestelle (Raf-1 Aminosäuren 55-131)



vermittelt. Die Interaktion der zweiten Ras-Bindestelle in der Cystein-reichen Domäne von Raf-1 ist für die vollständige Aktivierung von Raf-1 nötig [25]. Ein wichtiger Co-Faktor bei der Aktivierung von Raf-1 ist das anionische Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS), das die Bindung von Ras an die zweite Ras-Bindestelle vermittelt, indem es die Interaktion des 14-3-3 Proteins mit der zweiten Ras-Bindestelle ersetzt. Die vollständige Aktivierung von Raf-1 erfolgt nun durch Phosphorylierung an verschiedenen Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten [25].



**Abb. 1-3: Ras vermittelte Aktivierung von Raf-1.** Durch die GTP-Bindung von Ras kommt es zu einer starken Konformationsänderung, die die Translokation von Raf-1 an die Membran vermittelt. Die Ras-Raf-1-Interaktion erfolgt über zwei Domänen. Raf-1 ist sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand an die beiden Chaperone Hsp90 und p50 sowie ein 14-3-3 Protein gebunden, die beide Konformationen stabilisieren. Das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) bindet im aktiven Zustand an das 14-3-3-Protein und ermöglicht so die Bindung von Ras an die zweite Ras-Bindestelle von Raf-1. Zur vollständigen Aktivierung wird Raf-1 durch verschiedene Kinasen sowohl an Serin-/Threonin- als auch Tyrosin-Resten hyperphosphoryliert [25].

Neben der Interaktion mit Raf wechselwirkt aktiviertes Ras im GTP-gebundenen Zustand mit weiteren Proteinen, wobei diese ihrerseits Signalkaskaden aktivieren und somit verschiedenste biologische Funktionen erfüllen. So konnten u.a. Wechselwirkungen mit weiteren Serin-/Threonin-Kinasen (MEKK-1, PKC- $\zeta$ ), den Ras GAPs p120<sup>GAP</sup> und Neurofibromin (NF1), verschiedenen p110-Untereinheiten der PI<sub>3</sub>-Kinase sowie den RasGHRPs RasDGS, RGL/Rsb2 und RGL2/Rfl nachgewiesen werden [36]. Die Aktivierung von Ras löst also ein vielfältiges Spektrum zellulärer Antworten aus.

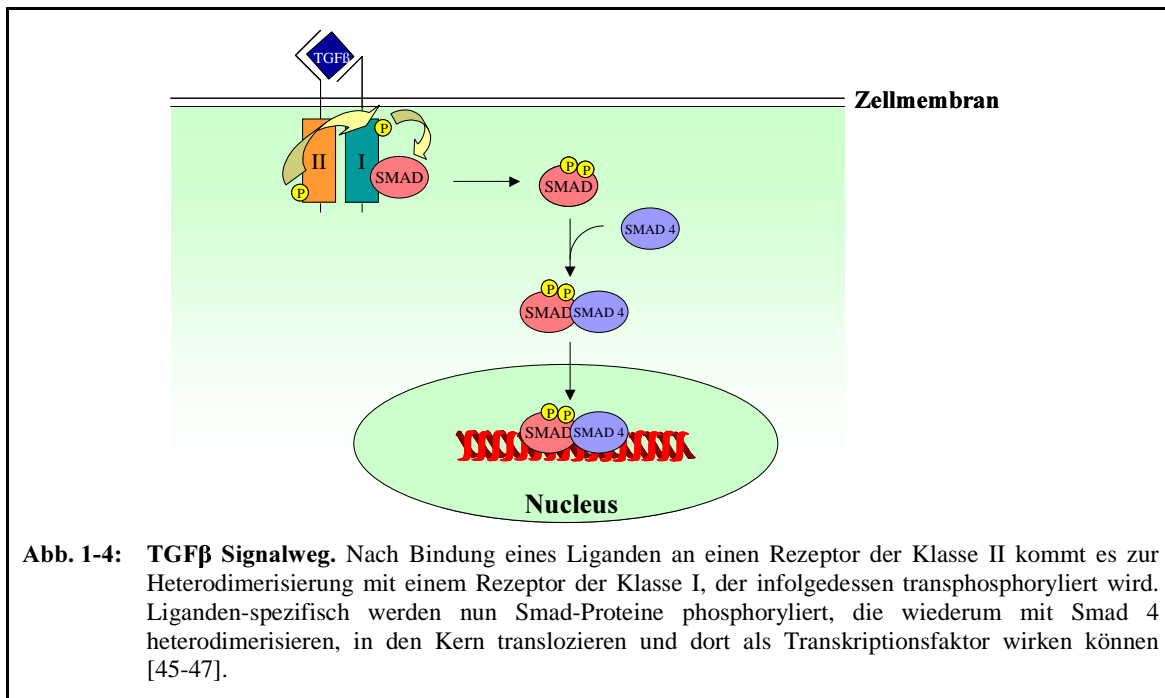
Verschiedene Mitglieder der Ras Überfamilie besitzen funktionelle Bedeutung bei der Kontrolle von Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und der Organisation des Zytoskeletts. Somit ist es nicht verwunderlich, dass 30% aller Tumore Mutationen in einem Ras-Gen aufweisen [20, 37]. Daher werden momentan starke Anstrengungen zur Auffindung selektiv wirksamer Substanzen, die Ras-abhängige Signalwege blockieren, unternommen. Eine relativ gut untersuchte Substanzklasse umfasst Inhibitoren des Enzyms Protein-

Farnesyltransferase, die die Zellproliferation insbesondere von malignen Zellen dadurch verhindern, dass Mitglieder der Ras-Überfamilie (Ras, RhoB) nicht isoprenyliert und somit nicht in die Membran integriert und aktiviert werden können [38-40]. Ebenfalls zur Auffindung von Inhibitoren der mitogenen Signalkaskade wurde ein Testsystem entwickelt, mit dem sich Hemmstoffe der Kinasen Raf-1, MEK1 und ERK2 detektieren lassen [41]. Die Wirksamkeit solcher Inhibitoren konnte kürzlich *in vivo* gezeigt werden. Durch die Verabreichung eines oral verfügbaren MEK-Kinasehemmstoffs konnte in Mäusen das Wachstum von Kolon-Karzinom-Zelllinien um 80% verringert werden [42]. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Unterbrechung mitogener Signale liegt in der Verhinderung der Wechselwirkung zwischen Ras und Raf. Ein solcher Protein-Protein-Interaktionshemmstoff wurde mit der anti-inflammatorisch wirksamen Substanz Sulindac identifiziert [43]. Diese nicht-steroidale Substanz wird im Körper zum Sulfid und zum Sulfon metabolisiert und besitzt als solche anti-tumorale Wirkung [43, 44]. Sulindac Sulfid bindet direkt an Ras und verhindert so die Wechselwirkung mit Raf. Darüber hinaus verhindert es die Anlagerung von CDC25 und p120<sup>GAP</sup>, die für den Nucleotid-Austausch bzw. die Beschleunigung der GTP-Hydrolyse verantwortlich sind [43]. Sulindac gehört zur Klasse der nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen und besitzt über seine Eigenschaft als Ras-Raf-Interaktionshemmstoff hinaus noch eine Reihe weiterer Wirkungen und somit auch Nebenwirkungen, indem sie u.a. in den Arachidonsäure-Stoffwechsel und somit die Prostaglandinsynthese eingreift. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Auffindung von Hemmstoffen der mitogenen Signalkaskade ein innovativer Ansatz für eine selektive Tumorthherapie sein kann.

### 1.2.2. Activin-Rezeptor Signalweg

Bei der Familie der TGF- $\beta$ -Rezeptoren handelt es sich um membranständige Rezeptoren mit Serin-/Threonin-Kinaseaktivität [45-47]. Wie in Abbildung 1-4 dargestellt, besteht ein Rezeptor aus einem Heterodimer einer Untereinheit der Klasse I und einer Untereinheit der Klasse II, die sich strukturell deutlich voneinander unterscheiden [47]. Die Rezeptor-Untereinheit der Klasse II sorgt für die Spezifität der Ligandenbindung und interagiert selektiv mit bestimmten Klasse I-Untereinheiten, während die Untereinheit der Klasse I nach erfolgter Bindung des Liganden für die Signalweiterleitung verantwortlich ist [45]. Nach Ligandenbindung rekrutiert der Klasse II-Rezeptor einen Rezeptor der Klasse I und transphosphoryliert diesen. Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt mittels der Phosphorylierung von Smad-Proteinen durch den im aktivierten Komplex befindlichen Rezeptor der Klasse I [48, 49]. Abhängig davon, welcher Ligand an die entsprechende Isoform des Rezeptors gebunden hat, werden die Proteine Smad 1, 5 oder 8 (Ligand: BMP,

„bone morphogenic protein“) bzw. 2 oder 3 (Ligand: TGF- $\beta$ , Activin) phosphoryliert [48]. Das phosphorylierte Smad-Protein ist nun in der Lage, mit Smad 4 ein Heterodimer zu bilden. Dieses kann in den Kern translozieren und dort durch direkte DNA-Bindung als Transkriptionsfaktor fungieren [48]. Die Smad-Proteine 6 und 7 besitzen inhibitorische Funktion. Sie können an Rezeptoren der Klasse I binden und so die Anlagerung von Rezeptor-regulierten Smads verhindern [48].



Bislang konnten jeweils ein TGF- $\beta$ -Rezeptor der Klasse I und II (T $\beta$ R-I bzw. T $\beta$ R-II) sowie jeweils zwei Activin-Rezeptoren der Klasse I (ActR-I und IB) bzw. der Klasse II (ActR-II und IIB) identifiziert werden [47, 48]. Als Liganden dienen die Zytokine TGF- $\beta$  und Activin, der Activin-Antagonist Inhibin, sowie verschiedene „bone morphogenic Proteins“ (BMPs) [46]. Bei den drei Zytokinen handelt es sich um dimere Polypeptide von etwa 80 Aminosäuren, die über mindestens eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Sie entstehen durch die homo- und heterodimere Kombinationen von mindestens drei (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3) bzw. zwei (Activin-  $\beta$ 1 und - $\beta$ 2) nahe verwandten Genprodukten [47]. TGF- $\beta$  inhibiert die Zellproliferation, vermittelt die Bildung extrazellulärer Matrix und reguliert die Zelldifferenzierung. Activin reguliert die Proliferation und Differenzierung endokriner Zellen des reproduktiven Systems und ist in der embryonalen Entwicklung bedeutsam [46, 47]. Inhibin antagonisiert und blockiert die Wirkung von Activin, indem es mit Activin um die selbe Bindungsstelle an Activin-Rezeptoren konkurriert. So vermittelt Activin beispielsweise die Synthese und Freisetzung von FSH („Follikel-stimulierendes Hormon“) aus der

Hypophyse, während Inhibin sowohl die Synthese als auch die Freisetzung von FSH verhindert [45].

Einige Rezeptoren der Klasse I können mit dem zytoplasmatischen Immunophilin FKBP12 („FK506 binding protein 12“) interagieren [50-52]. FKBP12 bindet an den Liganden-freien Rezeptor der Klasse I und wird nach erfolgter Ligandenbindung während der Heterodimerisierung mit dem Klasse II -Rezeptor und der Transphosphorylierung wieder freigesetzt [51]. Die genaue physiologische Funktion von FKBP12 ist nicht bekannt, FKBP12 scheint jedoch ein negativer Regulator des TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signalwegs zu sein. Eine mögliche Wirkweise könnte die Rekrutierung inhibitorisch wirksamer Proteine an den Klasse I -Rezeptor durch FKBP12 sein [51]. Zum anderen stabilisiert FKBP12 durch Bindung an die regulatorische Domäne die inaktive Konformation der Kinasedomäne und verhindert eine Transphosphorylierung ohne Ligandenbindung [52]. FKBP12 spielt darüber hinaus bei der Vermittlung der immunsuppressiven Wirkung von FK506 eine entscheidende Rolle [51, 53]. Nach Bindung an FKBP12 verhindert FK506 die Interaktion von FKBP12 mit seinen physiologischen Bindungspartnern [50, 53]. FK506 ist also ähnlich wie Sulindac Sulfid ein direkter Inhibitor von Protein-Protein-Interaktionen.

### 1.2.3. Testsysteme zur Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen

Spezifische Interaktionen zwischen Proteinen sind die Basis von vielen essentiellen biologischen Prozessen in Säugetierzellen. So bestehen zum Beispiel die Signalkaskaden, die zu Zellwachstum bzw. zur Zellteilung führen, aus einer hierarchischen Reihe von Protein-Protein-Interaktionen. Um das Netzwerk der Proteininteraktionen zu entschlüsseln, wurden verschiedene Techniken wie z.B. Co-Immunpräzipitation (Fällung von Proteinkomplexen mittels Antikörper), Quervernetzung von zwei interagierenden Proteinen mit anschließender Reinigung und Sequenzierung der Proteine oder das Yeast two-hybrid System entwickelt. Letzteres basiert auf der transkriptionellen Aktivierung eines Reportergens durch die Wechselwirkung zweier Fusionsproteine bestehend aus einem potentiell interagierenden Proteinpaar, das mit einer DNA-Bindedomäne bzw. einer Transkriptions-aktivierenden Domäne fusioniert ist [54-56]. So können zum einen neue Protein-Protein-Interaktionen unter Benutzung von cDNA-Bänken entdeckt werden, zum anderen ist es möglich, Inhibitoren einer bestimmten Protein-Protein-Interaktion zu detektieren [55]. Nachteile des Yeast two-hybrid Systems liegen darin, dass dieses nicht in Säugerzellen sondern ausschließlich in Hefen angewendet werden kann, dass die Transkription eines Reportergens nur eine indirekte Detektionsmethode darstellt und dass die Fusionsproteine in den Kern gelangen müssen, weshalb eine Verwendung von Membran-ständigen Proteinen nur sehr eingeschränkt machbar

ist [54]. Ein Ansatz zur *in vitro* Detektion einer großen Anzahl von Protein-Protein-Interaktionen bietet der „Universal Protein Array“ (UPA) [57]. Hierbei werden verschiedene aufgereinigte Proteine auf eine Zellulose-Membran gespottet und der Filter anschließend mit radioaktiv markierten Protein, DNA- oder RNA-Sonden inkubiert. Die Vorteile bestehen darin, dass eine mehrfache Hybridisierung eines Filters möglich ist und zur Detektion keine aufwendige Apparatur nötig ist. Nachteilig ist die sehr aufwendige Klonierung, Expression und Aufreinigung der Proteine [57].

Ein erstes System zur *in vivo* Detektion von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen wurde mit dem „protein-fragment complementation assay“ (PFC) entwickelt [58]. Hierbei werden zwei nicht-funktionale sich komplementierende Deletionsmutanten der murinen Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) mit potentiell interagierenden Proteinpaaren fusioniert. In DHFR-defizienten Zellen können Klone, die interagierende Proteinpaare aufweisen, direkt selektiert werden. Da in Zellen mit Wildtyp DHFR keine Signalamplifikation stattfindet, ist eine starke Überexpression der Protein-Interaktionspartner nötig, was zu Artefakten führen kann. Eine erfolgreiche Anwendung dieses Testsystems wurde für den Erythropoietin-Rezeptor und die mechanistische Aufklärung seiner Dimerisierung gezeigt [59].

Eine neuartige Methode zur direkten Detektion von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* und *in vivo* wurde mit der intracistronischen  $\beta$ -Galaktosidase Komplementation entwickelt [54]. Die erfolgreiche Aufklärung der  $\beta$ -Galaktosidase Kristallstruktur ermöglichte die funktionelle Zuordnung der Domänenstruktur und vermittelte ein weitergehendes Verständnis der  $\alpha$ -Komplementation, der Ausbildung eines funktionellen  $\beta$ -Galaktosidase Enzymkomplexes aus zwei nicht-funktionellen Deletionsmutanten [60, 61]. Bei der intracistronischen  $\beta$ -Galaktosidase Komplementation werden ebenfalls zwei nicht-funktionelle Deletionsmutanten verwendet, die aber im Gegensatz zur  $\alpha$ -Komplementation nur durch Fusion mit interagierenden Proteinpaaren einen aktiven Enzymkomplex bilden können, da die Affinität der beiden Deletionsmutanten zueinander zu niedrig für eine erfolgreiche Komplementation ist [62-64]. Nur bei Interaktion der beiden Proteine lässt sich somit eine Enzym-vermittelte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beobachten. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich z.B. die Fusion von Zellen beobachten, indem die zu fusionierenden Zellen jeweils ein Fusionsprotein bestehend aus einem interagierenden Proteinpärchen und einer  $\beta$ -Galaktosidase Deletionsmutante tragen, eine Enzymaktivität ist erst bei erfolgter Fusion zu beobachten [62]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht in der direkten Untersuchung bestimmter Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* und *in vitro* [63]. So konnte die Dimerisierung des membranständigen EGF-Rezeptors (EGF-R) in lebenden Zellen durch die Bildung chimärer Rezeptoren

bestehend aus der extrazellulären und transmembranären Domäne des EGF-R und jeweils einer Deletionsmutante der  $\beta$ -Galaktosidase beobachtet werden [65]. Da die Handhabung dieses Testsystems relativ einfach ist, besteht die Möglichkeit einer Hochdurchsatzanalyse von Substanzbibliotheken zur Auffindung spezifischer Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen [54]. Die Vorteile dieser Methode liegen zum einen in der Verwendung des fluorogenen Substrats Fluor-X-Gal, das bereits in minimalen Mengen sehr gut zu detektieren ist. Eine Überexpression der Fusionsproteine ist daher nicht nötig. Zum anderen lassen sich Protein-Protein-Interaktionen fortlaufend beobachten. Ungewiss bleiben jedoch die sterischen Limitationen des Systems, da es sich um eine komplexe Enzymreassoziatio**n** handelt [54]. Aufgrund dieser Vorzüge gegenüber anderen Systemen zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Komplementation zur Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf-Proteininteraktion ausgewählt (siehe Kapitel 1.4).

### **1.3. Validierung von PKB/Akt als Zielprotein in der Tumorthherapie**

Der zweite Teil dieser Promotionsarbeit umfasste die Validierung der Kinase PKB/Akt im Hinblick auf die Entwicklung neuartiger anti-tumoraler Strategien. In der Literatur ist die anti-apoptotische Wirkung von PKB/Akt als zentralem Mediator von zellulären Überlebenssignalen ausführlich beschrieben [110-113, 115]. Wenig untersucht hingegen ist die therapeutisch relevante Verbindung von PKB/Akt zu Chemo**resistenz** bzw. die Mechanismen, durch die PKB/Akt an der Vermittlung von Chemo**resistenz** beteiligt ist [114]. Die meisten der heute in der Klinik verwendeten Chemotherapeutika töten Tumorzellen über die Induktion von Apoptose [173]. Dabei werden verschiedene Signalwege unterschieden: Zum einen die Auslösung von Apoptose durch membranständige Rezeptoren (sogenannte Todesrezeptoren), darüber hinaus die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder anderen Stresssignalen und schließlich die Induktion des p53 Signalwegs nach dem Auftreten von DNA-Schäden [66]. Ein wesentliches Aufgabengebiet dieser Promotionsarbeit bestand in der Aufklärung von Mechanismen, durch die PKB/Akt Chemo**resistenz** vermittelt.

#### **1.3.1. Apoptose und Apoptotische Signalwege**

Der programmierte Zelltod (Apoptose) stellt einen essentiellen Mechanismus zur Eliminierung geschädigter und potentiell gefährlicher Zellen bei der Organbildung während der Embryogenese und später bei der Homöostase multizellulärer Organismen dar [66].

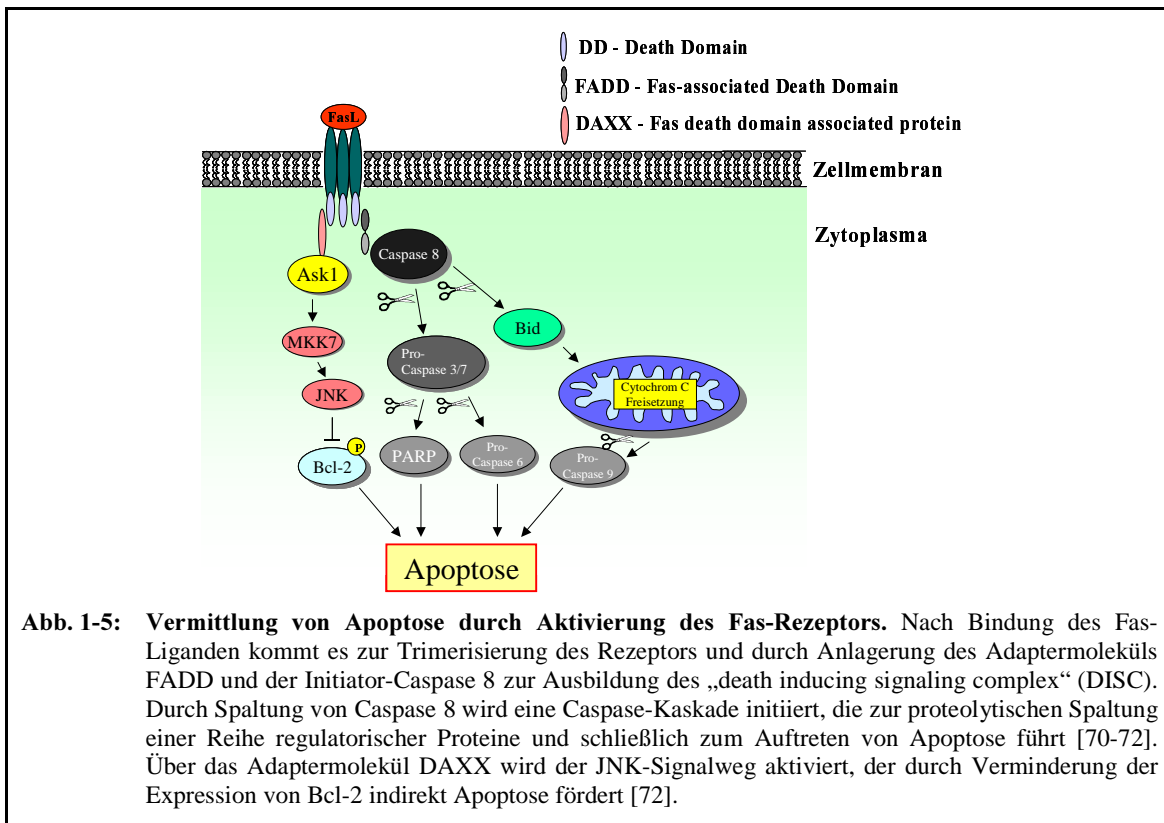
Apoptose ist ein höchst organisierter und reguliert verlaufender Vorgang und umfasst die Fragmentierung der DNA, die Schrumpfung der Zelle und den Zerfall der Zelle in Membranschlossene vesikuläre Partikel, die durch Phagozytose eliminiert werden, ohne dass es zu einer entzündlichen Reaktion kommt [67]. Apoptose kann durch eine Vielzahl von Stimuli hervorgerufen werden wie z.B. durch Signale während der Entwicklung des Organismus, durch zellulären Stress oder durch Unterbrechung des Zellzyklus [66]. Eine Reihe von zellulären Faktoren, die für die Regulation, Koordination und Ausführung von Apoptose verantwortlich sind, konnten identifiziert werden. In Säugerzellen wird Apoptose dabei im Wesentlichen durch drei Signalwege hervorgerufen. Der erste Weg umfasst die Auslösung von Apoptose durch membranständige Rezeptoren (sogenannte Todesrezeptoren) wie beispielsweise TNF $\alpha$ - oder Fas-Rezeptor, die nach der Bindung ihres Liganden Adaptermoleküle rekrutieren und so den Ablauf einer Caspase-Kaskade einleiten, was schließlich zum Absterben der Zelle führt [66]. Der zweite Weg wird durch Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst und durch Proteine der Bcl-2 Familie reguliert. Durch Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien wird wiederum eine Caspase-Kaskade initiiert, die schließlich zu Apoptose führt. Der dritte Signalweg wird nach DNA-Schädigung aktiviert, wobei das Tumorsuppressorprotein p53 eine Schlüsselrolle einnimmt. Nach Aktivierung von p53 kommt es u.a. zur Initiation einer Caspase-Kaskade. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist noch nicht völlig aufgeklärt [66].

### **Caspasen – zentrale Effektoren der Apoptose**

Charakteristisch für fast alle Signalwege zur Auslösung von Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen [67-69]. Bislang konnten 14 Caspasen aus Säugerzellen identifiziert und kloniert werden. Diese Cystein-Proteasen werden in der Zelle als inaktive Zymogene synthetisiert und besitzen eine vergleichbare Struktur bestehend aus vier Domänen: Einer N-terminalen Pro-Domäne unterschiedlicher Größe, einer großen und einer kleinen Untereinheit sowie einer Linker-Region zwischen diesen beiden Untereinheiten, die von Asparginsäure-Resten begrenzt werden. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den einzelnen Domänen, einer Abspaltung der Pro-Domäne und der Zusammenlagerung der kleinen und großen Untereinheit zur aktiven Caspase [68]. Die aktive Caspase besitzt eine sehr hohe Substratspezifität, die durch vier Aminosäuren innerhalb der Substratbindestelle vermittelt wird. Innerhalb der proteolytischen Kaskade werden je nach ihrer Aufgabe Initiator- und Effektor-Caspasen unterschieden, wobei Initiator-Caspasen (Caspase 8, 9, 10) eine längere Pro-Domäne besitzen als Effektor-Caspasen (Caspase 2-7, 11-13) [68].

## Todesrezeptor-vermittelte Apoptose

Der Fas-Rezeptor (Fas-R) ist ein 48kDa Typ I Transmembranprotein und gehört zur Familie der sogenannten Todesrezeptoren [70-72]. Nach Bindung des Fas-Liganden (Fas-L) trimerisiert der Rezeptor und induziert Apoptose durch die Bildung des „death inducing signaling complex“ (DISC) [72]. Dieser entsteht durch Anlagerung des Adaptermoleküls FADD und der Initiator-Caspase 8 an die intrazellulären „Death Domains“ (DD) des trimeren Rezeptors (Abb. 1-5 ) [71]. FADD vermittelt über seine „Death Effector Domain“ (DED) die autokatalytische Spaltung von Caspase 8, die nun wiederum die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktivieren kann [73]. Nach der Aktivierung von Caspase 6 durch Caspase 3 sind diese Effektor-Caspasen in der Lage eine Vielzahl von Proteinen proteolytisch zu spalten. Dazu zählen Signalproteine wie Raf-1, Akt-1 oder MEKK-1, Regulatoren der DNA-Transkription oder -Replikation wie MDM2 oder Rb, Proteine, die den DNA/RNA Metabolismus regulieren wie DNA-PK oder PARP sowie eine Reihe weiterer Proteine mit verschiedenen Funktionen, darunter Inhibitoren von Endonucleasen wie CAD, die anschließend in den Kern translozieren und DNA zerschneiden können [71].



Durch Bindung von DAXX an die „Death Domain“ und der Rekrutierung und Aktivierung von „Apoptosis Signaling Regulation Kinase 1“ (ASK1) wird der JNK- sowie der p38-MAP-Kinase-Signalweg aktiviert, wodurch die Expression von Überlebensfaktoren wie Bcl-2 sinkt

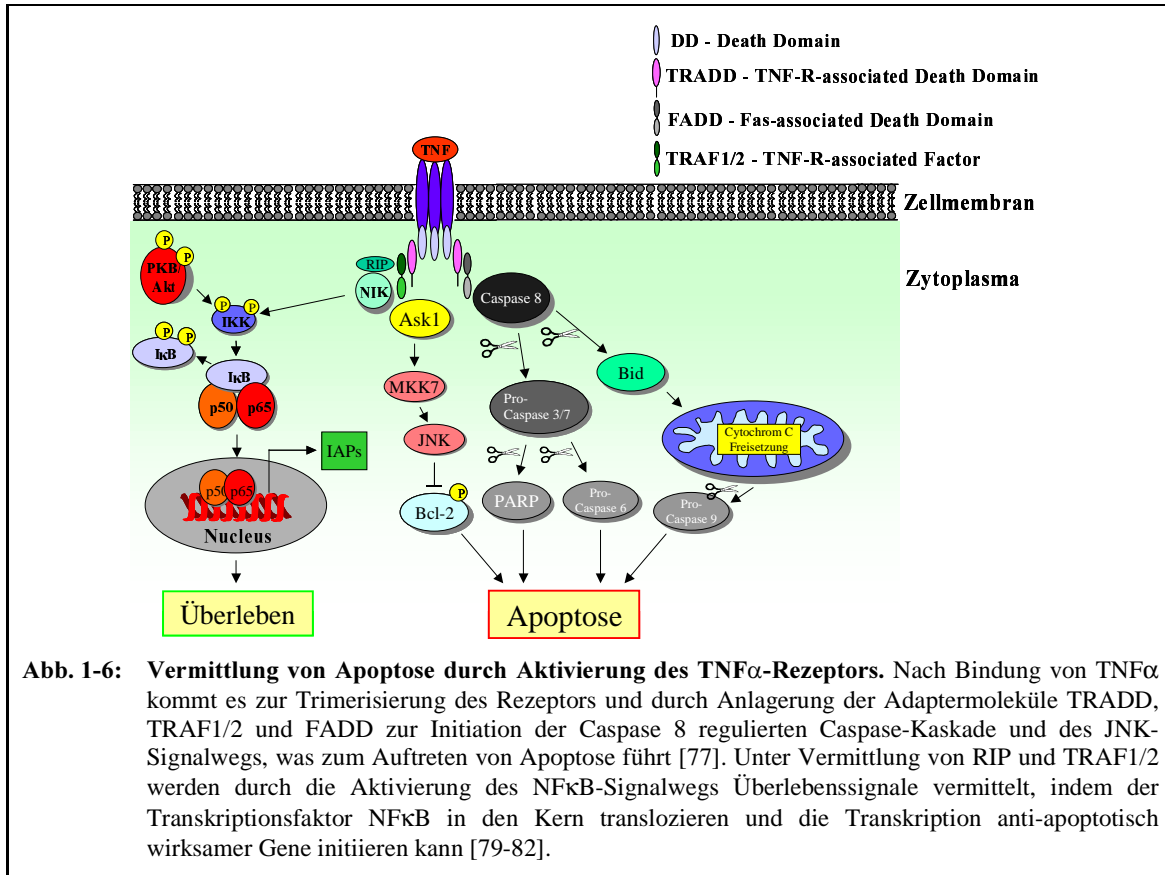


[71]. Eine wichtige negative Regulation des Fas-R Signalwegs erfolgt durch die Rekrutierung des Proteins c-FLIP in den DISC [74-76]. c-FLIP existiert in einer langen (c-FLIP<sub>l</sub>) und einer kurzen (c-FLIP<sub>s</sub>) Splicevariante, wobei beide Varianten Zellen vor Fas-L induzierter Apoptose schützen [74, 75]. c-FLIP<sub>l</sub> besitzt mit seinen zwei „Death Effector Domains“ und seiner Caspase-ähnlichen Domäne eine Struktur, die vergleichbar mit Pro-Caspase 8 ist. Der Caspase-ähnlichen Domäne fehlen im aktiven Zentrum allerdings einige Reste, die für die katalytische Aktivität bedeutsam sind [75]. Nach der Rekrutierung von Pro-Caspase 8 und c-FLIP<sub>l</sub> in den DISC werden beide Proteine autokatalytisch zwischen der p18 und p10 Untereinheit gespalten. Es entstehen zwei stabile inaktive Intermediate von 43kDa, die im DISC gebunden bleiben und somit die Anlagerung und Aktivierung weiterer Moleküle Pro-Caspase-8 verhindern [75]. c-FLIP<sub>s</sub> hingegen weist in seiner Struktur lediglich die beiden „Death Effector Domains“ auf, verhindert aber vollständig die Spaltung von Pro-Caspase 8 im DISC [75]. Dass dieser Mechanismus auch physiologisch von Bedeutung ist, zeigt sich darin, dass Zelllinien von B-Zelllymphomen, die konstitutiv c-FLIP exprimieren, resistent gegen Fas-L vermittelte Apoptose sind [76].

Ein weiteres Mitglied der Familie der Todesrezeptoren ist der TNF $\alpha$ -Rezeptor (TNF $\alpha$ -R) [70, 77]. Dieser ist hauptsächlich in der Regulation des Immunsystems involviert, indem er entzündliche Prozesse steuert sowie die Entwicklung und Erhaltung der peripheren lymphoiden Organe und der Milz reguliert [70]. Die Transmembranrezeptoren vom Typ I vermitteln im Gegensatz zum Fas-R sowohl apoptotische Signale als auch Überlebenssignale (Abb. 1-6). Nach Bindung des Liganden trimerisiert der Rezeptor und rekrutiert verschiedene Adaptermoleküle an seine „Death Domain“ [77]. Das wichtigste Adaptermolekül des TNF $\alpha$ -R1-Signalwegs ist TRADD, das die Anlagerung von TRAF1/2 an den Rezeptorkomplex vermittelt und so den JNK- und den NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert [78]. Darüber hinaus vermittelt TRADD durch die Assoziation mit FADD die Aktivierung von Caspase 8 und der nachgeschalteten Caspase-Kaskade [73, 77]. Wie im Fas-R-Signalweg führen sowohl die Aktivierung der Caspase 8 regulierten Kaskade als auch die Initiation von Ask1 und des JNK-Signalwegs - wie bereits oben beschrieben - zum Auftreten von Apoptose [77].

Darüber hinaus vermittelt der TNF $\alpha$ -R Überlebenssignale durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs [79-82]. Nach Ligandenbindung bindet das Adaptermolekül TRADD die Kinase RIP, die wiederum mit der „NF $\kappa$ B-inducing kinase“ (NIK) wechselwirkt und diese durch Phosphorylierung aktiviert [77, 81]. NIK phosphoryliert nun seinerseits Proteine des IKK Komplex, der eingehende Phosphorylierungssignale u.a. auch von weiteren anti-apoptotisch wirksamen Kinasen wie PKB/Akt integriert [81, 82]. NF $\kappa$ B wird im inaktiven Zustand durch

Bindung an seinen Inhibitor (I $\kappa$ B) im Zytosol zurückgehalten. Nach Aktivierung des IKK Komplex wird I $\kappa$ B ebenfalls phosphoryliert, daraufhin ubiquitiniert und durch das Proteosom degradiert [77, 81]. NF $\kappa$ B kann nun in den Zellkern translozieren und dort die Transkription anti-apoptotischer Proteine steuern [82].

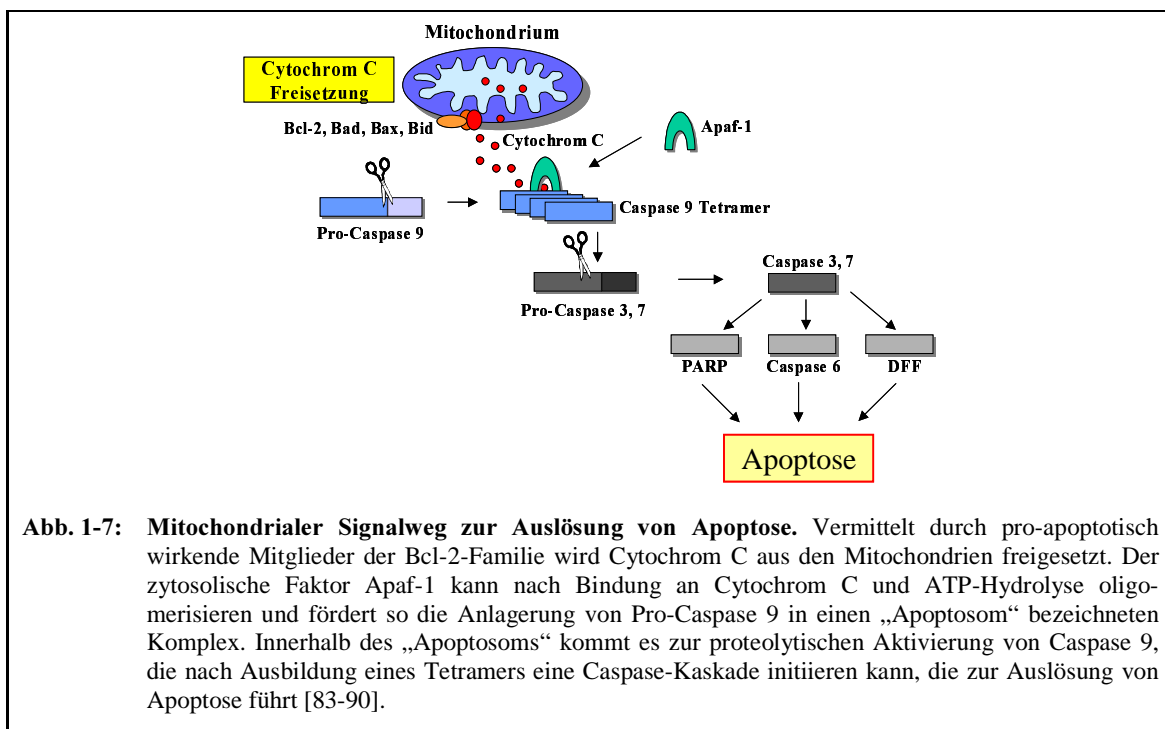


### Der mitochondriale Signalweg zur Vermittlung von Apoptose

Eine zweite bedeutende Signalkaskade bei der Initiierung von Apoptose neben den Todesrezeptor-Signalwegen stellt der mitochondriale Signalweg dar, dessen Regulation durch Proteine der Bcl-2-Familie vermittelt wird (Abb. 1-7) [83-94]. Es konnten bisher mindestens 16 Mitglieder der Bcl-2-Familie detektiert werden, die sich in pro- (z.B. Bax, Bak, Bad, Bid, Bcl-x<sub>S</sub>) und anti-apoptotisch (z.B. Bcl-2, A1/Bfl-1, Bcl-x<sub>L</sub>) wirksame Proteine unterteilen lassen [83]. Nach Heterodimerisierung sind einige dieser Proteine in der Lage in der mitochondrialen Membran porenartige Komplexe zu bilden, wobei das Verhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Bcl-2-Homologen darüber entscheidet, ob Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird oder nicht [84-86]. Nach Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol bindet dieses ebenso wie ATP an den zytosolischen Faktor Apaf-1. Durch Hydrolyse von ATP zu ADP kommt es zur Oligomerisierung von Apaf-1 [89]. Über seine „Caspase

recruitment domain“ (CARD) rekrutiert Apaf-1 nun Caspase 9 im Verhältnis 1:1 in einen ca. 700kDa großen Komplex, der als „Apoptosom“ bezeichnet wird [88-90].

Innerhalb des „Apoptosoms“ kommt es zur proteolytischen Spaltung der Initiator-Caspase 9 und somit zu deren Aktivierung [89, 90]. Aktivierte Caspase 9 ist nun ihrerseits in der Lage eine Caspase-Kaskade zu aktivieren, wobei es zunächst zur Proteolyse von Pro-Caspase 3 und 7 kommt, die wiederum Pro-Caspase 6 aktivieren [87]. Die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 sind - wie bereits oben beschrieben - an der Proteolyse einer Vielzahl von regulatorischen und metabolischen Proteinen beteiligt. Darüber hinaus kann Caspase 3 im Zuge eines Verstärkungsmechanismus die Caspasen 2, 6, 8 und 10 aktivieren [87]. Nach der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien können die anti-apoptotisch wirksamen Mitglieder der Bcl-2-Familie das Auftreten von Apoptose nicht mehr verhindern. Sie besitzen ihre Hauptfunktion innerhalb der mitochondrialen Membran also in der Verhinderung der Cytochrom C Freisetzung [91].

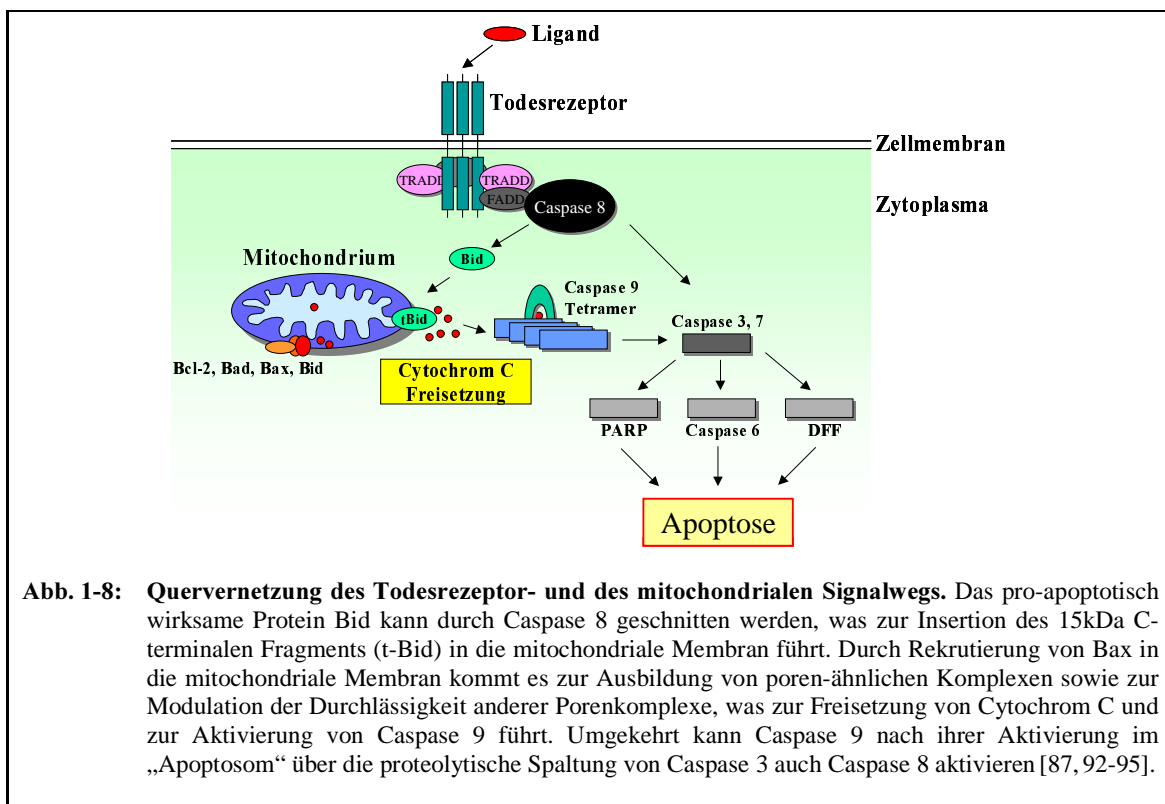


**Abb. 1-7: Mitochondrialer Signalweg zur Auslösung von Apoptose.** Vermittelt durch pro-apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2-Familie wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Der zytosolische Faktor Apaf-1 kann nach Bindung an Cytochrom C und ATP-Hydrolyse oligomerisieren und fördert so die Anlagerung von Pro-Caspase 9 in einen „Apoptosom“ bezeichneten Komplex. Innerhalb des „Apoptosoms“ kommt es zur proteolytischen Aktivierung von Caspase 9, die nach Ausbildung eines Tetramers eine Caspase-Kaskade initiieren kann, die zur Auslösung von Apoptose führt [83-90].

### Verknüpfung von Todesrezeptor-vermitteltem und mitochondrialem Apoptose-Signalweg

Die beiden apoptotischen Hauptsignalwege laufen auf der Ebene der Aktivierung von Caspase 3 und 7 zusammen und sind auch darüber hinaus miteinander verknüpft (Abb. 1.-8) [92]. Bid - ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie - wird durch Caspase 8 geschnitten, was zur Insertion des 15kDa C-terminalen Fragments (t-Bid) in die mitochondriale Membran führt [92, 93]. Ebenso wie ungeschnittenes Bid liegt Bax - ein

weiteres pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie - in gesunden Zellen zytosolisch vor [93]. t-Bid vermittelt nach seiner Insertion in die mitochondriale Membran eine Konformationsänderung von Bax, was diesem Protein ebenfalls die Translokation in die äußere mitochondriale Membran ermöglicht [93]. Bax und t-Bid können nun an der Freisetzung von Cytochrom C mitwirken, indem sie gemeinsam mit anderen Proteinen poren-ähnliche Oligomere bilden und durch Anlagerung an weitere andere Porenkomplexe deren Durchlässigkeit modifizieren [92, 94]. Durch die Interaktion von Bcl-x<sub>1</sub> mit Bid kann die pro-apoptotische Funktion von Bid/t-Bid verhindert werden [95]. Über die proteolytische Spaltung des Proteins Bid kann also aktivierte Caspase 8 die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung von Caspase 9 vermitteln. Umgekehrt kann Caspase 9 nach ihrer Aktivierung im „Apoptosom“ über die proteolytische Spaltung von Caspase 3 auch Caspase 8 aktivieren, was deutlich die Quervernetzung der beiden Signalwege zeigt [87]. Fas-L induzierte Apoptose lässt sich dagegen nicht durch Bcl-2 oder Bcl-x<sub>1</sub> verhindern [96].



**Abb. 1-8: Quervernetzung des Todesrezeptor- und des mitochondrialen Signalwegs.** Das pro-apoptotisch wirksame Protein Bid kann durch Caspase 8 geschnitten werden, was zur Insertion des 15kDa C-terminalen Fragments (t-Bid) in die mitochondriale Membran führt. Durch Rekrutierung von Bax in die mitochondriale Membran kommt es zur Ausbildung von poren-ähnlichen Komplexen sowie zur Modulation der Durchlässigkeit anderer Porenkomplexe, was zur Freisetzung von Cytochrom C und zur Aktivierung von Caspase 9 führt. Umgekehrt kann Caspase 9 nach ihrer Aktivierung im „Apoptosom“ über die proteolytische Spaltung von Caspase 3 auch Caspase 8 aktivieren [87, 92-95].

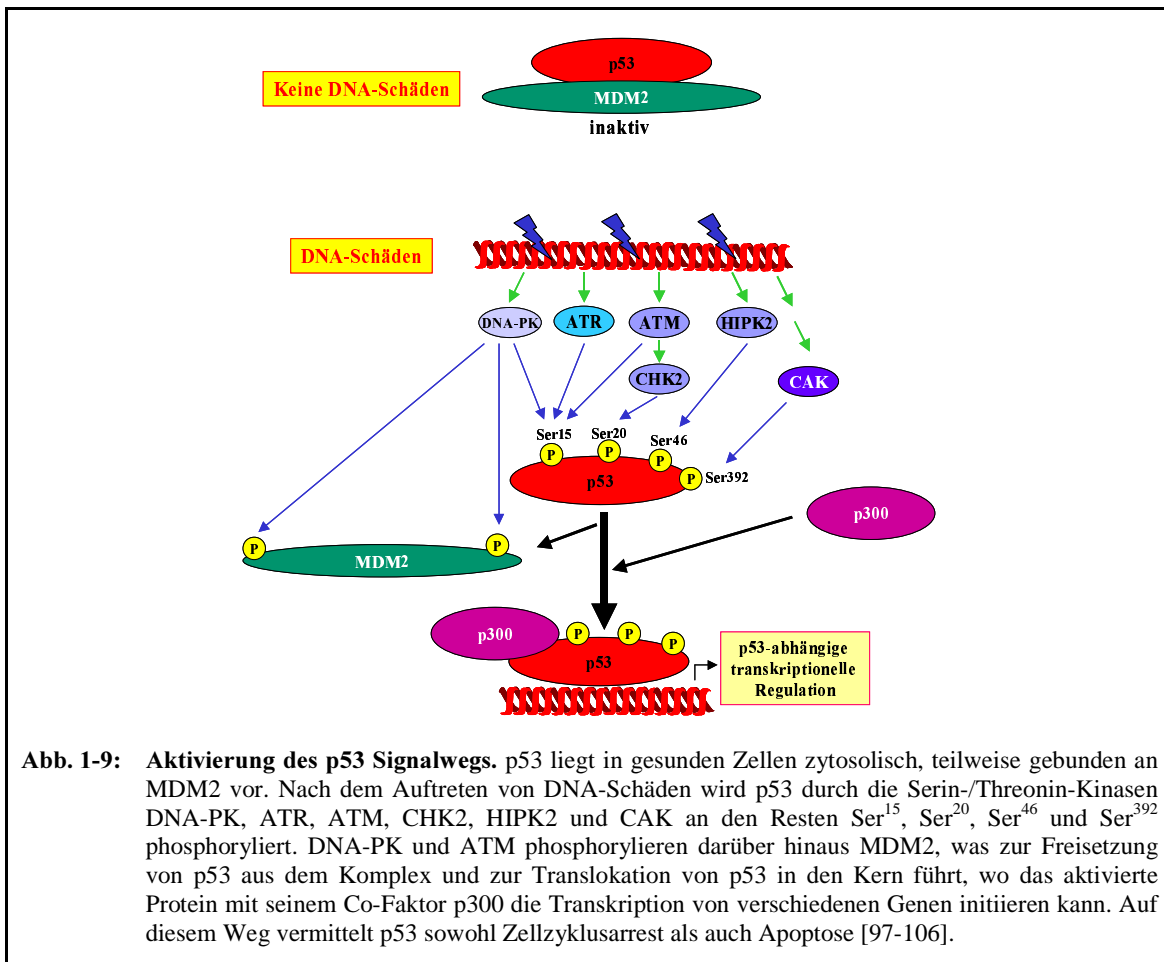
### Apoptose durch Induktion des p53 Signalwegs

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation von Apoptose und des Zellzyklus nach Einwirkung von endogenen oder exogenen Stresssignalen auf die Zelle (Abb. 1-9) [97-109]. 50% aller Tumore exprimieren durch das Auftreten von Mutationen im p53-Gen kein funktionales p53-Protein, was die Bedeutung von p53 als

Tumorsuppressor verdeutlicht [97, 98]. In gesunden Zellen liegt p53 zytosolisch, teilweise gebunden an MDM2 vor [97]. Durch Bindung an p53 verhindert MDM2 die transkriptionelle Aktivität von p53 und kann die Ubiquitinierung und Degradation von p53 durch das Proteosom vermitteln. Als Antwort auf das Auftreten von DNA-Schäden wird p53 durch verschiedene Faktoren aktiviert: Die Serin-/Threonin-Kinasen ATM, ATR und DNA-PK werden in einer sehr frühen Phase der DNA-Schädigung durch Bindung an Doppelstrangbrüche aktiviert und phosphorylieren p53 innerhalb seiner Transaktivierungsdomäne an Ser<sup>15</sup> [101]. ATM aktiviert darüber hinaus die „Checkpoint Kinase 2“ (CHK2), die wiederum p53 innerhalb seiner Interaktionsdomäne mit MDM2 an Ser<sup>20</sup> phosphoryliert [101]. Die Phosphorylierung von MDM2 durch die aktivierte DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) sowie durch aktivierte ATM verhindert die Interaktion von MDM2 mit p53 und reguliert somit die Transaktivierung von p53 [102, 103]. Die apoptotische Aktivität von p53 ist abhängig von der Phosphorylierung an Ser<sup>46</sup>. Diese erfolgt durch die „homeodomain-interacting protein kinase-2“ (HIPK2), die sich im Kern nach ihrer Aktivierung an PML-3 und p53 anlagert, p53 an Ser<sup>46</sup> phosphoryliert und somit die p53-abhängige Transkription von Proteinen apoptotischer Signalwege reguliert [104]. Ein Komplex aus „casein kinase 2“ (CAK2) und dem transkriptionellen Chromatin Elongationsfaktor FACT sorgt nach dem Auftreten von DNA-Schäden insbesondere in Folge von UV-Bestrahlung für die Phosphorylierung von p53 an Ser<sup>392</sup> [105]. Darüber hinaus wird die Aktivität von p53 durch Phosphorylierung und Acetylierung weiterer Reste reguliert.

Nach seiner Aktivierung reguliert p53 zusammen mit dem Co-Faktor p300 durch transkriptionelle Induktion der Proteine GADD45, 14-3-3 $\sigma$  sowie des Zellzyklus-Inhibitors p21 die Zellzyklus-Kontrollpunkte der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase und vermittelt somit Wachstumsarrest und DNA-Reparatur [106]. Zum anderen kann aktiviertes p53 Zellen nach DNA-Schädigung durch zytotoxische Substanzen, freie Radikale oder Bestrahlung, nach Entzug von Wachstumsfaktoren, nach viraler Infektion oder Deregulation der Expression von Proteinen des Zellzyklus in Apoptose treiben [99, 106]. Die Vermittlung von Apoptose erfolgt zum einen durch transkriptionelle Induktion der Expression des Fas-R, der Serin-Protease Cathepsin D, des pro-apoptischen Proteins Bax, das die Freisetzung des „apoptosis inducing factor“ (AIF) sowie von Cytochrom C aus den Mitochondrien vermittelt und des „IGF binding protein 3“ (IGF-BP3), das die Signaltransduktion des IGF-R inhibiert [99, 106]. An Ser<sup>46</sup> phosphoryliertes p53 kann die Expression des p53-abhängigen Apoptose-induzierenden Proteins 1 (p53AIP1) initiieren, was zur Zerstörung des elektrochemischen Gradienten der inneren mitochondrialen Membran und somit zu Caspase-unabhängigem

Zelltod führt [203]. Darüber hinaus kann p53 nach seiner Aktivierung aber auch mittels Transkriptions-unabhängiger Mechanismen Apoptose induzieren. Dazu zählen die Deregulation des Transkriptionsfaktors E2F-1, die Repression der Expression von Bcl-2 und IGF1-R sowie die Vermittlung der Translokation des Fas-R aus dem Golgi-Apparat in die Zellmembran [99, 106]. Die Regulation von p53 erfolgt zum einen über die sehr kurze Halbwertszeit des Proteins, zum anderen wird die Transkription von MDM2 durch Ser<sup>15</sup> phosphoryliertes p53 induziert, wodurch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife entsteht [106].



### 1.3.2. PKB/Akt-Kinase

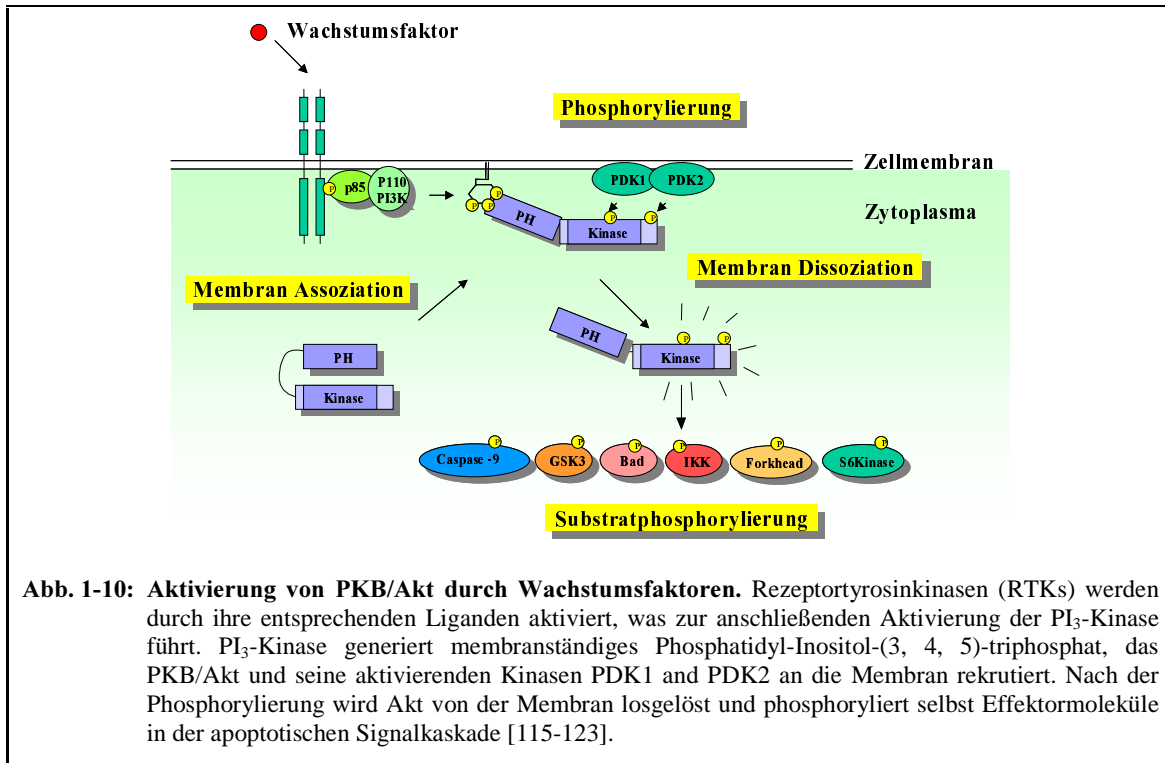
Die Unterdrückung apoptotischer Signale ist eine Voraussetzung für Tumorzellen, solide Tumore zu bilden und unter Bedingungen zu überleben, die eigentlich den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Zu den Mechanismen der Verhinderung des Eintretens von Apoptose zählen der Verlust von Caspase-Aktivität durch verminderte Expression oder Inaktivierung z.B. durch Mutationen, die verstärkte Expression von Inhibitoren der Apoptose

(IAP) wie beispielsweise Survivin, XIAP oder cIAP, die Überexpression anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>l</sub>), die Verringerung der Expression proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie oder deren Inaktivierung durch Phosphorylierung (z.B. Bad), die verminderte Expression von Todesrezeptoren, die Überexpression des Fas-L an der Oberfläche zur Abtötung von T-Zellen oder der Verlust der p53-Aktivität durch Mutationen innerhalb des Gens [107, 108]. Darüber hinaus wurden weitere Proteine und Mechanismen entdeckt, die Tumorzellen resistent gegenüber apoptotischen Stimuli machen. Die Protein Kinase B/Akt (PKB/Akt) konnte hierbei als ein Schlüsselmolekül zur Weiterleitung von Überlebenssignalen ausgehend von Wachstumsfaktorrezeptoren identifiziert werden, die zur effektiven Unterdrückung von Apoptose führen [109-123]. Die Aktivität von PKB/Akt spielt in der Tumorgenese eine bedeutende Rolle: Die Aktivierung von PKB/Akt ist ein wichtiges Überlebenssignal in der Tumorprogression [110, 113], eine Überexpression und konstitutive Aktivierung von PKB/Akt konnte in verschiedenen humanen Tumoren nachgewiesen werden (Lunge, Schilddrüse, Prostata, Ovar, Brust) [18, 19, 111] und schließlich konnte gezeigt werden, dass PKB/Akt die Tumorzellinvasivität durch erhöhte Zellmotilität und Metalloproteinaseproduktion steigert [112]. Desweiteren wird PKB/Akt bei Überexpression und konstitutiver Aktivierung in Tumoren mit der Vermittlung von Chemo-resistenz gegenüber Zytostatika und Bestrahlung in Verbindung gebracht [18, 114].

Bislang konnten drei Isoenzyme von PKB/Akt (PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2, PKB $\gamma$ /Akt3) identifiziert werden, denen unterschiedliche Funktionen in der Zelle zugeordnet werden und die sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene in verschiedenen Geweben differenziell exprimiert werden [115-117]. Alle Isoformen besitzen eine zentrale Kinasedomäne mit einer Serin-/Threonin-Spezifität sowie eine N-terminale „pleckstrin homology“ (PH) Domäne, die entweder Protein-Protein- oder Lipid-Protein-Wechselwirkungen vermittelt [115].

In Abbildung 1-10 ist das Modell zur Aktivierung von PKB/Akt dargestellt. Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihren Rezeptor wird die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-K) aktiviert und kann somit mittels Phosphorylierung membranständiges Phosphatidyl-Inositol-(1,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) generieren [115-118]. Nach Bildung von PIP<sub>3</sub> kann die PH-Domäne von PKB/Akt die Translokation der Kinase an die Membran vermitteln. Durch die Lipid-Protein-Wechselwirkung kommt es zu einer Konformationsänderung von PKB/Akt, wodurch die Kinasedomäne offen gelegt wird [118]. Zur vollständigen Aktivierung von PKB/Akt müssen die beiden regulatorischen Reste Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> phosphoryliert werden [118, 119]. Die Phosphorylierung an Thr<sup>308</sup> erfolgt durch die „IP<sub>3</sub>-dependent protein kinase-1“ (PDK1) [120]. PDK1 besitzt neben seiner Kinasedomäne eine C-terminale PH-Domäne,

wodurch PDK1 ebenfalls an  $IP_3$  binden und zusammen mit PKB/Akt1 an der Zellmembran kolokalisieren kann [118, 120]. Die Kinase, die PKB/Akt an Ser<sup>473</sup> phosphoryliert, konnte bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden, wobei neben MAPKAP-Kinase2, PDK1, ILK und PRK2 auch eine Autophosphorylierung durch PKB/Akt selbst diskutiert wird [116]. Neuere Hinweise deuten jedoch darauf hin, dass die Ser<sup>473</sup>-Phosphorylierung durch „Integrin-linked Kinase“ (ILK) erfolgt [121-123]. Aktivierte PKB/Akt-Kinase kann nun von der Membran ins Zytoplasma dissoziieren und dort seine Substrate phosphorylieren [115-118].

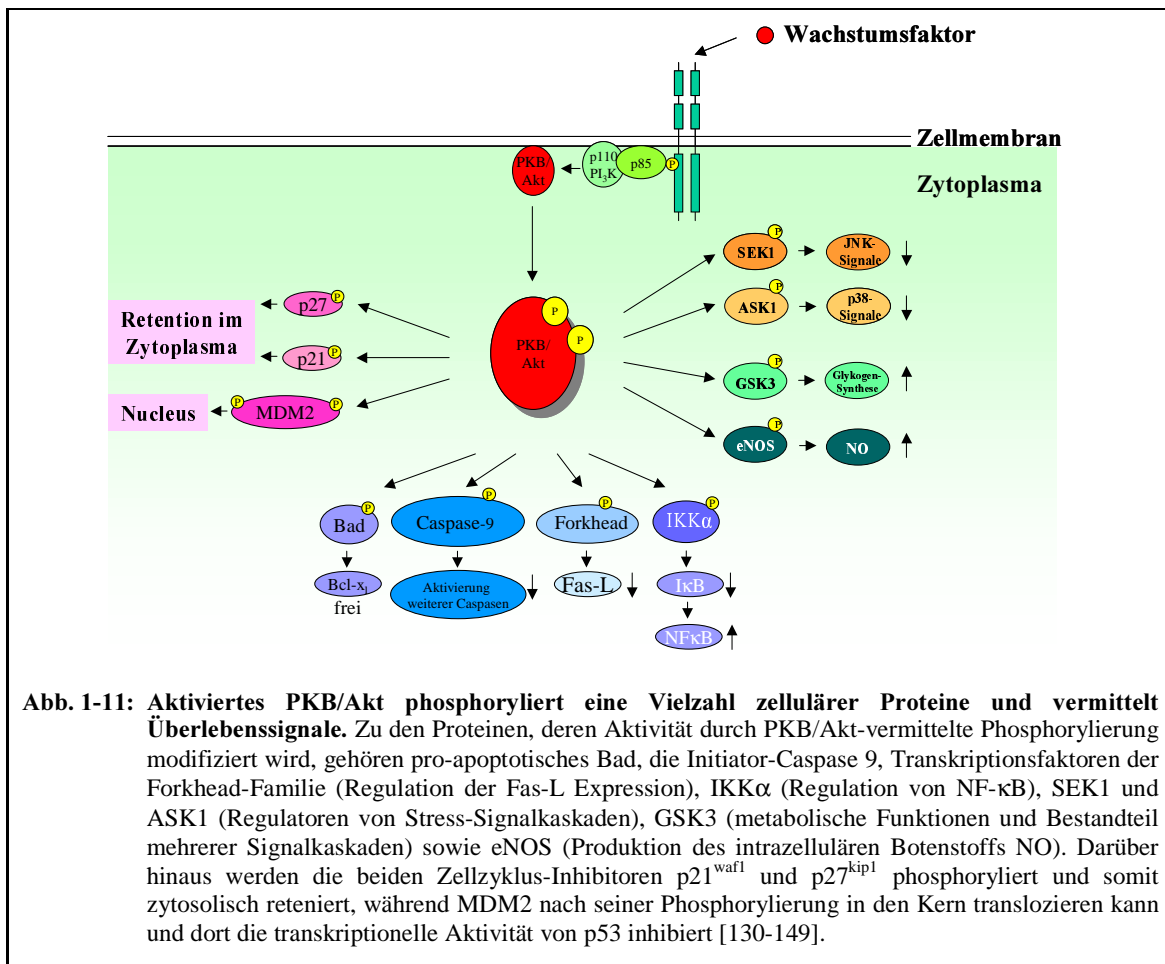


Die Aktivität von PKB/Akt scheint darüber hinaus durch Tyrosin-Phosphorylierung an zwei Resten innerhalb der Aktivierungsdomäne reguliert zu werden [124]. Das Protein Tcl1 konnte als Co-Faktor von PKB/Akt identifiziert werden, der durch Bindung an die PH-Domäne die Kinaseaktivität von aktiviertem PKB/Akt verstärkt und die Translokation in den Kern vermittelt [125]. Eine bedeutende Rolle bei der negativen Regulation des PKB/Akt-Signalwegs nimmt das Tumorsuppressorgen PTEN ein, das in vielen Tumoren mutiert oder deletiert vorliegt [126-128]. PTEN reguliert zelluläre Prozesse wie den Zellzyklus, die Transkription und Translation bestimmter Proteine oder auch Apoptose. Als Protein-Phosphatase kann PTEN sowohl Shc als auch FAK dephosphorylieren und so den MAP-Kinase- bzw. Integrin-Signalweg negativ regulieren. Als Lipid-Phosphatase dephosphoryliert PTEN  $PIP_3$  zu  $PIP_2$  und wirkt somit als direkter Gegenspieler der  $PI_3$ -Kinase [127]. Dies hat zur Folge, dass durch Verringerung der Menge des intrazellulären Botenstoffes  $PIP_3$  PKB/Akt



in geringerem Maße aktiviert wird [126, 127]. Darüber hinaus wurde kürzlich mit CTMP ein weiteres Protein entdeckt, das die Aktivität von PKB/Akt1 durch C-terminale Bindung negativ reguliert [129].

Nach seiner Phosphorylierung und Membrandissoziation ist aktiviertes PKB/Akt in der Lage, verschiedene Substrate, die den Zellzyklus regulieren, die in apoptotische Signaltransduktionswege eingreifen oder die die Transkription von verschiedenen Genen beeinflussen, zu phosphorylieren und somit in deren Aktivität zu modifizieren (Abb. 1-11) [115, 130-149]. Alle Substrate der Serin-/Threonin-Kinase PKB/Akt besitzen die gemeinsame Phosphorylierungskonsensussequenz RXXXS/T [115].



PKB/Akt kann an verschiedenen Stellen der apoptotischen Signalkaskaden direkt mittels Phosphorylierung oder indirekt mittels Regulation der Transkription bestimmter Gene eingreifen und durch Vermittlung von Überlebenssignalen Apoptose verhindern [115]. So wird das pro-apoptische Protein Bad durch PKB/Akt an Ser<sup>136</sup> phosphoryliert, was zum Verlust der Bindungsfähigkeit und einhergehender Inaktivierung der anti-apoptischen Proteine Bcl-2 bzw. Bcl-x<sub>1</sub> führt [131-133]. Nach Phosphorylierung des nukleären Faktors

CREB („cAMP-response element binding protein“) an Ser<sup>133</sup> durch PKB/Akt bindet dieser an cAMP-responsive Elemente innerhalb der DNA und ermöglicht so die Transkription bestimmter Gene [134]. Zu diesen Genen zählt auch das anti-apoptotische Protein Bcl-2, dessen Expression CREB-abhängig gesteigert wird [135]. PKB/Akt verhindert dadurch aber nicht nur indirekt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, sondern kann darüber hinaus direkt die Initiation der proteolytischen Effektor-Caspase Kaskade durch Phosphorylierung und einhergehende Inaktivierung von Caspase 9 effizient unterbinden [136].

Der Forkhead Transkriptionsfaktor FKHRL wird ebenfalls durch PKB/Akt an Thr<sup>24</sup>, Ser<sup>256</sup> und Ser<sup>319</sup> phosphoryliert, wodurch er mittels Interaktion mit 14-3-3-Proteinen zytosolisch retiniert wird und somit nicht mehr die Transkription von Genen initiieren kann [137-139]. Auch AFX als weiteres Mitglied der Forkhead Familie wird durch PKB/Akt im Kern an Ser<sup>193</sup> phosphoryliert. Der Exportrezeptor Crm 1 sorgt Phosphorylierungsstatus-unabhängig für die Delokalisierung von AFX aus dem Kern in das Zytosol. Da die Phosphorylierungsstelle inmitten der Kernlokalisationssequenz liegt, kann AFX nun nicht mehr zurück in den Kern gelangen und verliert somit seine transkriptionelle Aktivität [140]. Dadurch kommt es u.a. zur Verminderung der Expression des Fas Liganden [115]. IKK $\alpha$  und  $\beta$  sind zwei Kinasen, die für die Regulation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B verantwortlich sind. PKB/Akt phosphoryliert IKK $\alpha$  an Thr<sup>23</sup> und sorgt somit gemeinsam mit der Kinase NIK oder anderen Kinasen innerhalb des Ras-Signalwegs, die IKK $\alpha$  an weiteren Resten phosphorylieren können, für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach Bindung von TNF $\alpha$  an seinen Rezeptor bzw. nach Stimulierung durch PDGF [141, 142]. NF- $\kappa$ B kann nun in den Zellkern translozieren und dort die Transkription anti-apoptotischer Gene initiieren [115].

Der JNK- und der p38-Kinase-Signalweg sind zwei MAP-Kinase Kaskaden, die durch Stresssignale wie beispielsweise inflammatorische Zytokine, oxidativen Stress oder osmotischen Schock aktiviert werden. PKB/Akt greift direkt in diese Signalwege ein, indem es die MAP-KK SEK1 an Ser<sup>78</sup> phosphoryliert und somit SEK1-vermittelte Apoptose durch Inhibition der SEK1-Aktivität verhindert [143]. Durch PKB/Akt-vermittelte Phosphorylierung an Ser<sup>83</sup> kann auch die Aktivität von ASK1, einer MAP-KKK, die der JNK- und der p38-Kinase vorgeschaltet ist, gesenkt und somit die Vermittlung apoptotischer Signale verhindert werden [144].

Die Regulation der Zellzyklus-arretierenden Signale der beiden CDK-Inhibitoren p21<sup>waf1</sup> und p27<sup>kip1</sup> durch PKB/Akt erfolgt durch Kompartimentierung [109]. Nach Phosphorylierung von p21<sup>waf1</sup> an Thr<sup>145</sup> und von p27<sup>kip1</sup> sind die phosphorylierten Proteine nicht mehr in der Lage, in

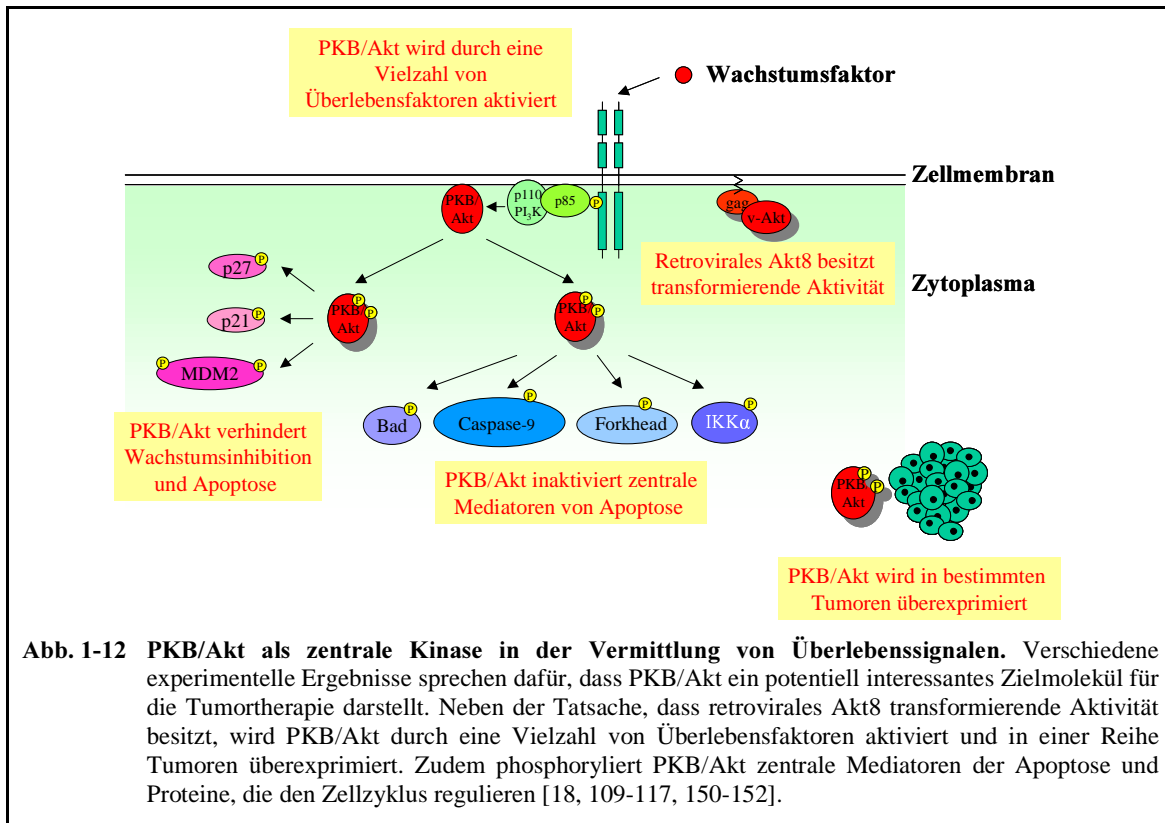
den Zellkern zu translozieren. Dadurch kann es nicht mehr zur Hemmung von Zyklin-CDK-Komplexen und somit zum Zellzyklusarrest kommen [109, 145]. Phosphoryliertes p21<sup>waf1</sup> besitzt zudem nur noch eine sehr schwache Affinität zu CDKs und zu PCNA, wodurch keine Komplexbildung mit DNA-Polymerase und damit auch keine Inhibition der DNA-Replikation stattfindet [145]. Durch Bindung von zytosolischem Phospho-p21<sup>waf1</sup> an ASK1 wird darüber hinaus das Auftreten von ASK1-abhängiger Apoptose verhindert [109]. Die Retention von Phospho-p27<sup>kip1</sup> erfolgt hauptsächlich durch Bindung an 14-3-3-Proteine [109].

Als weiteres Substrat von PKB/Akt wurde kürzlich MDM2 beschrieben, das zelluläres Überleben und das Fortschreiten des Zellzyklus durch Inhibition des Tumorsuppressorproteins p53 vermittelt. Nach Phosphorylierung an Ser<sup>166</sup> und Ser<sup>186</sup> durch PKB/Akt kann Phospho-MDM2 vom Zytosol in den Zellkern translozieren, freies p53 binden und so die transkriptionelle Aktivität von p53 verringern [146]. Durch Bindung an MDM2 wird p53 ubiquitiniert und proteosomal degradiert, was zur Erniedrigung des zellulären p53-Spiegels führt [146].

Weitere Substrate von PKB/Akt sind u.a. die Glykogen Synthetase Kinase 3 (GSK3) sowie die endotheliale NO Synthase (eNOS) [147, 149]. GSK-3 $\alpha$  und  $\beta$  wird durch PKB/Akt an Ser<sup>21</sup> bzw. Ser<sup>9</sup> phosphoryliert und dadurch inaktiviert [115, 116]. Neben seiner Bedeutung für den Metabolismus von Glucose durch Regulation der Aktivität der Glykogen Synthetase, der Translokation des Glucosetransporters GLUT4 in die Plasmamembran und der Induktion der GLUT1-Synthese besitzt GSK3 eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg [115]. Der Wnt-Signalweg ist an der Entwicklung und der Erhaltung der Organe und Gewebe beteiligt. Im inaktivierten Zustand liegt das Signalmolekül  $\beta$ -Catenin als zytoplasmatischer Komplex gebunden an die Proteine Axin, „adenomatous polyposis coli“ (APC) und GSK3 vor, nach der Aktivierung des Signalwegs stellt  $\beta$ -Catenin einen transkriptionellen Co-Aktivator der Tcf/LEF-Transkriptionsfaktoren dar [204]. Darüber hinaus verstärkt GSK3 die Proteolyse von Zyklin D1. Hemmung von GSK3 führt demnach zu einer Stabilisierung von Zyklin D1 und den Wiedereintritt in den Zellzyklus [148]. Die Phosphorylierung von eNOS an Ser<sup>1179</sup> aktiviert das Enzym und führt zur Produktion von NO, einem intrazellulären Botenstoff, der verantwortlich für die Erhaltung des systemischen Blutdrucks, vaskulären Umbau und Angiogenese ist [149]. Die genaue physiologische Bedeutung dieser Regulation ist aber bisher noch unvollständig geklärt.

Bei Betrachtung verschiedenster Substrate der Kinase PKB/Akt ergeben sich eine Vielzahl experimenteller Hinweise, dass PKB/Akt ein Schlüsselenzym in der Modulierung apoptotischer Signalkaskaden in Tumorzellen darstellt und kausal an der Vermittlung von

Überlebenssignalen und der Unterdrückung des programmierten Zelltods beteiligt ist. PKB/Akt stellt daher potentiell ein attraktives Molekül zur Findung neuartiger Inhibitoren zur Unterbindung der anti-apoptotischen Signale in der Tumorthherapie dar.



Verschiedene Beobachtungen und Rationale für PKB/Akt als Zielstruktur in der Tumorthherapie sind in Abbildung 1-12 nochmals zusammengefasst:

- PKB/Akt selbst stellt ein Proto-Onkogen dar, das als humanes Homolog zum *v-Akt* Onkogen des akut transformierenden T-Zell-Lymphom-Retrovirus Akt8 entdeckt wurde [116, 117]. Das *v-Akt* Genprodukt besitzt aufgrund der Fusion mit dem retroviralen gag-Protein, das eine Translokation zur Zellmembran vermittelt, eine konstitutiv aktive Kinaseaktivität. PKB/Akt selbst besitzt keine transformierende Aktivität, wenn es in murinen Fibroblasten überexprimiert wird. Embryonale Fibroblasten werden allerdings durch Membran-inseriertes PKB/Akt1, 2 und 3 transformiert [111, 150, 151].
- Eine Vielzahl apoptotischer Stimuli kann durch Überlebensfaktoren, die zur Aktivierung der PI<sub>3</sub>-Kinase führen, unterbunden werden. PKB/Akt ist hierbei ein zentrales Molekül, das indirekt durch die PI<sub>3</sub>-K aktiviert wird und dessen Aktivität von den gleichen Wachstumsfaktoren abhängt, die auch eine Aktivierung der PI<sub>3</sub>-K bewirken [118]. Dominant negative Formen von PKB/Akt können Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli resensitivieren [150].

- PKB/Akt besitzt eine Schlüsselrolle bei der Modulierung apoptotischer Effektormoleküle wie z.B. Bad, Caspase-9, Forkhead oder IKK und verschiebt die Balance innerhalb dieser Kaskade in Richtung Unterbindung apoptotischer Signale [116].
- Durch Veränderung der Kompartimentierung der Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27 sowie durch Verhinderung der transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 mittels der Phosphorylierung von MDM2, wird Zellzyklusarrest und Apoptose verhindert [109].
- Die drei Isoformen von PKB/Akt konnten in verschiedenen humanen Tumoren in amplifizierter und/oder konstitutiv aktivierter Form detektiert werden. Zu den Tumorentitäten gehören u.a. Gliome, Magen-, Prostata-, Brust-, Ovarial- oder Pankreas-karzinome. Manche dieser Tumore (insbesondere Gliome und Pankreastumore) sind als intrinsisch chemoresistent beschrieben und es bestehen keine effektiven Chemotherapie-Optionen [19, 110, 111, 152].

Da eine Aktivierung von PKB/Akt nicht nur für die Unterdrückung apoptotischer Stimuli sorgt, sondern auch eine gewisse Rolle bei der Vermittlung von Chemoresistenz zu spielen scheint, stellt diese Kinase ein attraktives Zielmolekül für neuartige anti-tumorale Therapie-strategien dar [114]. Die Entwicklung potenter PKB/Akt Inhibitoren dürfte demnach nicht nur die apoptotischen Signalwege in Tumorzellen wiederherstellen, sondern auch zu einer Sensitivierung von Tumoren gegenüber heutigen Standard-Chemotherapeutika führen.

Wie kürzlich gezeigt werden konnte, wiesen Akt2(-/-) knock-out Mäuse eine deutliche Beeinflussung des Glucosestoffwechsels (Hyperglykämie), Insulin-Resistenz und ein mildes, Diabetis mellitus-ähnliches Syndrom auf, während Akt1(-/-) knock-out Mäuse organische Wachstumsstörungen und ansonsten einen relativ milden Phänotyp offenbarten [205, 206]. Die metabolischen Abnormitäten, die durch das Fehlen von PKB/Akt2 hervorgerufen wurden, konnten durch PKB/Akt1 und 3 nicht kompensiert werden, was den deutlich größeren Einfluss von PKB/Akt2 auf den Glucosestoffwechsel im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen unterstreicht. Der relativ milde Phänotyp in PKB/Akt1 knock-out Mäusen könnte dagegen darauf zurückzuführen sein, dass PKB/Akt2 und 3 zelluläre Aufgaben von PKB/Akt1 teilweise übernehmen können. Zur Minimierung von Nebenwirkungen erscheint es daher sinnvoll, einen selektiven Hemmstoff von PKB/Akt1 und nicht von PKB/Akt2 zu suchen, da dieser den Glucosestoffwechsel nur in geringem Maße beeinflussen sollte. Aufgrund der sehr großen Homologie der PKB/Akt Isozym-Kinasedomänen wird es jedoch schwierig sein, eine solche Selektivität zu erreichen.

#### 1.4. Ziele der Arbeit

Die Aufgabenstellung dieser Promotionsarbeit umfasste zwei Arbeitsgebiete, die in der pharmazeutischen Wirkstoffforschung von zentraler Bedeutung sind: Zum einen die Entwicklung von Testsystemen zur Wirkstofffindung sowie zum anderen die Identifizierung und Validierung von zellulären Zielstrukturen, durch deren Modulation sich ein therapeutischer Nutzen erzielen lässt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein Testsystem etabliert werden, mit dem sich spezifische Inhibitoren der Protein-Protein-Interaktion von Ras und Raf-1 *in vitro* detektieren lassen. In einer Vielzahl maligner Transformationen spielt die Dysregulation der Ras-Signalkaskade eine bedeutende Rolle, wobei der Protein-Protein-Interaktion zwischen Ras und Raf bei der Aktivierung dieses mitogenen Signalwegs eine Schlüsselfunktion zukommt [20, 37]. Durch Inhibition dieser Interaktion könnte daher tumorales Wachstum verringert werden. Als System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wurde die intracistronischen  $\beta$ -Galaktosidase Komplementation ausgewählt, bei der zwei nicht-funktionelle Deletionsmutanten der  $\beta$ -Galaktosidase durch Fusion mit interagierenden Proteinpaaren einen aktiven Enzymkomplex bilden können [62-64]. Bereits eine schwache Inhibition der Ras-Raf-Interaktion durch die Zugabe potentieller Inhibitoren ließe sich so über eine Verringerung der  $\beta$ -Galaktosidase Enzymaktivität mittels eines fluorogenen Substrats sehr gut detektieren.

Der zweite Teil der Arbeit umfasste die Validierung der Kinase PKB/Akt als ein potentielles Zielmolekül in der Tumorthherapie. In einer Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen wurde die Bedeutung von PKB/Akt als zentralem Mediator zellulärer Überlebenssignale beleuchtet und verschiedene zelluläre Substrate von PKB/Akt identifiziert [109, 115]. Bei der Analyse verschiedener ovarialer und Lungenkarzinom-Zelllinien wurden darüber hinaus Hinweise gefunden, dass eine Überexpression bzw. konstitutive Aktivierung von PKB/Akt mit dem Auftreten von Chemoresistenz korreliert und somit PKB/Akt bei der Vermittlung von Chemoresistenz beteiligt sein könnte [18, 114]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die Entwicklung geeigneter zellulärer Modelle die Kausalität von konstitutiver Aktivierung der Kinase PKB/Akt und dem Auftreten von Chemoresistenz dargelegt sowie molekulare Mechanismen der Vermittlung von Chemoresistenz durch PKB/Akt aufgeklärt werden.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Autoklav	Fedegari/Tecnomara
Beta-Counter	Trilux <sup>®</sup> Microbeta - Perkin Elmer
Brutschränke	Forma Scientific
Elektrophoresekammern	Sub <sup>™</sup> DNA Cell - BioRad
Elektroporator	GenePulser <sup>™</sup> - BioRad
Eis-Maschine	Ziegra
Flüssigchromatographiesystem	ÄKTA <sup>™</sup> Prime - Amersham Pharmacia
Geldokumentation	TV-Zoom Kamera - Cosmicar
Heizplatte / Rührer	Ikamag RCT - IKA-Labortechnik
Inkubationsschüttler	Modell G25 - New Brunswick Scientific
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
Mikrowellenherd	NN-K206B - Panasonic
Mikroskop	Telaval 31 - Zeiss
Mikrotiterplatten-Photometer	Victor <sup>®</sup> 1420 Multilabel Counter - Wallac
MilliQ Anlage	Milli-Q UF Plus - Millipore
Mini-Coldlab	Bromma
Multipette	Eppendorf
pH-Meter	761 Calimatic - Knick
Pipetboy	Acu - Tecnomara
Proteingel-Elektrophoresekammer	MiniProtean <sup>®</sup> 3 - BioRad
Proteingel-Blotting Apparat	Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell - BioRad
Schüttler	REAX 2000 - Heidolph
Schüttler	Mts 4 - IKA-Labortechnik
Sterilbank	Meissner + Wurst
Sequenziergerät	ABI Prism Genetic Analyzer 310
Spannungsgeber	EPS 500/400 - Pharmacia LKB
Spannungsgeber (Proteingele)	Powerpac 200 - Biorad
Taumler	GFL
Thermocycler	GeneAmp 9700 TC - Perkin Elmer
Thermomixer	Modell 5437 - Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5402 - Eppendorf
Tischzentrifuge	<u>Rotor:</u> F45-18
Tischzentrifuge	Biofuge 15R - Heraeus
Tischzentrifuge	<u>Rotor:</u> #3743 (max. 17000rpm)
Tischzentrifuge	Megafuge1.0R - Heraeus
Tischzentrifuge	<u>Rotor:</u> #2705 (max. 5000rpm)
Transilluminator	Spectroline
Überkopfschüttler	Heidolph
Ultrazentrifuge	L8-M - Beckman
UV/VIS-Spektral-Photometer	<u>Rotor:</u> SW-55Ti
Vakuum Konzentrator	UVIKON XS - Bio-Tek-Instruments
Wasserbäder	Bachofer
	GFL

Waage  
Zellzählgerät  
Zentrifuge

MC1 Laboratory LC620D - Sartorius  
Particle Counter - Coulter  
RC Plus - Sorvall  
Rotor: GSA / GS3 / SS34

## 2.2. Datenverarbeitung

Graph Pad Prism  
Lab Power Junior  
Vector NTI 5.2.1

Graph Pad Software, San Diego, USA  
Lab Power Software, Neufahrn  
InforMax, München

## 2.3. Verbrauchsmaterialien

### Produkt

Blottingpapier  
Centriplus™ Concentrators YM-50  
Combitips  
Dialyseschlauch (Durchmesser: 2,54cm)  
Einfrierröhrchen  
Einmalpipetten  
Elektroporationsküvetten  
Falcon Röhrchen 15ml  
Falcon Röhrchen 50ml  
Film Biomax ML  
Gewebekulturflasche T25  
Gewebekulturflasche T75  
Gewebekulturflasche T175  
Gewebekulturplatte, 6-Loch, klar  
Gewebekulturplatte, 24-Loch, klar  
Gewebekulturplatte, 96-Loch, klar  
96-Lochplatten, ½ Volumen, High Binding  
Petrischale, unbeschichtet  
Pipetten  
PVDF-Membran  
Reaktionsgefäße (1.5 und 2ml)  
Sterilfilter  
Vakuum Filtrationssystem, 50ml /0,22µM  
Zellkulturschalen Nucleon® (10cm / 14cm)  
Zytostatika-Schutzhandschuhe

### Hersteller Vertrieb

Schleicher & Schuell, Dassel  
Amicon, Beverly, USA  
Eppendorf, Hamburg  
Medicell International, London, England  
Nalge Nunc Int., Roskilde, Dänemark  
Costar, Corning, USA  
Eppendorf, Hamburg  
Greiner Labortechnik, Frickenhausen  
Greiner Labortechnik, Frickenhausen  
Kodak / Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Falcon, Franklin Lakes, USA  
Greiner Labortechnik, Frickenhausen  
Greiner Labortechnik, Frickenhausen  
Falcon, Franklin Lakes, USA  
Falcon, Franklin Lakes, USA  
Greiner Labortechnik, Frickenhausen  
Costar, Corning, USA  
Greiner Labortechnik, Frickenhausen  
Eppendorf, Hamburg  
Millipore, Bedford, USA  
Eppendorf, Hamburg  
Schleicher & Schuell, Dassel  
Millipore, Bedford, USA  
Nalge Nunc Int., Roskilde, Dänemark  
Berner, Elmshorn

## 2.4. Chemikalien

### Produkt

ABTS Tabletten  
Acrylamidstammllösung (30%)  
Agarose NA  
Albumin, Rind Fraktion V  
Ammoniumacetat  
Ammoniumperoxodisulfat (APS)

### Hersteller/Vertrieb

Roche Diagnostics, Mannheim  
Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden  
Biomol, Hamburg  
Merck, Darmstadt  
Merck, Darmstadt



Ampicillin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
ATP	Roche Biochemicals, Mannheim
Bacto® Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto® Peptone	Difco, Detroit, USA
Bacto® Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto® Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia, Uppsals, Schweden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Entwickler: Processing chemicals	Kodak / Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fixierbad: X-Omat et RP-X-Omat A	Kodak / Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES, Hemisodium Salz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IGEPAL CA-630 (NP 40)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Imidazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IPTG	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nickel-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Nickel-NTA Superflow Sepharose	Qiagen, Hilden
Nickelsulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS Dulbecco's, 1x	Biochrom KG, Berlin
PMS (N-Methyl-dibenzopyrazin-methylsulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polyethylen-Glycol MW8000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-Glu-Tyr	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2-Propanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail for Yeast	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rainbow coloured Protein Marker	Amersham Pharmacia, Piscataway, USA
Sacharose	Merck, Darmstadt
Salmon sperm DNA, Na <sup>+</sup> -Salz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salpetersäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure, 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Temed (N-N-N-N-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Titriplex III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin

Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
X-Gal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
XTT (Natrium-3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4 tetrazolium] bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzensulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

## 2.5. Biochemikalien

### 2.5.1. Restriktionsendonukleasen

Bam H I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Bsi W I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Cla I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Eco 47 III	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Fsp I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Hind III	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Kpn I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Nde I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Nhe I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Not I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Pme I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Pml I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Sac I	New England Biolabs, Schwalbach/Ts

### 2.5.2. DNA-modifizierende Enzyme

CIP (calf intestine phosphatase)	Roche Biochemicals, Mannheim
Pfu Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach/Ts
Taq Polymerase	Roche Biochemicals, Mannheim

### 2.5.3. Antikörper

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Bestellnummer/Hersteller</b>
anti-A1 (Bfl-1) polyklonal, Kaninchen	1:750	<i>sc-8351</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti- $\beta$ -Actin monoklonal, Maus Ascites	1:7500	<i>#A5441</i> Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Akt polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9272</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Akt1-Sepharose polyklonal, Ziege		<i>sc-1618</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Akt-Phospho-Thr308 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9275</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Akt-Phospho-Ser473 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9271</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA

anti-Akt-Phospho-Ser473 polyklonal, Kaninchen	1:1000	68601N BD Biosciences, Heidelberg
anti-Apaf-1 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>sc-8339</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Bax monoklonal, Maus, B-9	1:500	<i>sc-7480</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Bcl-2 monoklonal, Maus, C-2	1:750	<i>sc-7382</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Bcl-x <sub>s/1</sub> polyklonal, Kaninchen	1:750	<i>sc-1041</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Caspase 3 polyklonal, Kaninchen	1:500	#9662 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Caspase 3 cleaved polyklonal, Kaninchen	1:1000	#9661 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Caspase 7 polyklonal, Kaninchen	1:1000	#9492 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Caspase 7 cleaved polyklonal, Kaninchen	1:1000	#9491 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Caspase 8 monoklonal, Maus, 1C12	1:1000	#9746 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Caspase 9 polyklonal, Kaninchen	1:1000	#9502 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Caspase 9 p35 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>sc-8355</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Caspase 9 cleaved polyklonal, Kaninchen	1:1500	#9501 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-Caspase 9-Phospho Ser196 polyklonal, Ziege	1:750	<i>sc-11755</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-FADD polyklonal, Kaninchen	1:1000	341282 Calbiochem-Novabiochem, San Diego, USA
anti-FAK polyklonal, Kaninchen	1:2000	<i>F-2918</i> Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-FAS (Apo-1) polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>sc-714</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-human Apo-1/FAS-FITC monoklonal, Maus		<i>BMS151FI</i> Bender MedSystems, Wien, Österreich
anti-FKBP12 polyklonal, Kaninchen	1:2000	<i>SA-218</i> Biomol Laboratories, Plymouth, USA
anti-FLAG, M2 monoklonal, Maus	1:7500	<i>F3165</i> Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-FLAG, M2, Affinity Gel monoklonal, Maus		<i>A1205</i> Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Flip <sub>s/1</sub> polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>sc-8347</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

anti-Flip $\alpha$ polyklonal, Kaninchen	1:2000	<i>1161</i> Prosci, Poway, USA
anti-Flip $\gamma/\delta$ polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>2055</i> Prosci, Poway, USA
anti- $\beta$ -Galactosidase monoklonal, Maus Ascites	1:5000	<i>Z3781</i> Promega, Madison, USA
anti-Penta-HIS monoklonal, Maus	1:1000	<i>1007691</i> Qiagen, Hilden
anti-c-IAP polyklonal, Kaninchen	1:750	<i>sc-7943</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-IGF-1-R $\beta$ polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>sc-713</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9242</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ -Phospho Ser32 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9241</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-MDM2 monoklonal, Maus, Ab-2	1:1000	<i>OP115T</i> Oncogene Research Products, Boston, USA
anti-NF $\kappa$ B p50 polyklonal, Ziege	1:1000	<i>sc-1190</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-NF $\kappa$ B p65 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>sc-372</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-p21 monoklonal, Maus, F-5	1:750	<i>sc-6246</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-p27 monoklonal, Maus, F-8	1:750	<i>sc-1641</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-p53 monoklonal, Maus, Bp53-12	1:1000	<i>sc-263</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-p53-Phospho Ser15 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9284</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-p53-Phospho Ser20 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9287</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-p53-Phospho Ser46 polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#2521</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-PARP polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9542</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-PTEN polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>#9552</i> Cell Signaling Technology, Beverly, USA
anti-RIP polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>sc-7881</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Survivin polyklonal, Kaninchen	1:1000	<i>2235</i> Prosci, Poway, USA
anti-TNF-Rezeptor1 monoklonal, Maus, H-5	1:1000	<i>sc-8436</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

anti-TRADD polyklonal, Ziege	1:1000	<i>sc-1163</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-XIAP polyklonal, Kaninchen	1:1000	#2042 Cell Signaling Technology, Beverly, USA
<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Bestellnummer/Hersteller</b>
anti-Maus IgG-HRPO	1:5000	<i>NEF 822</i> NEN Life Science Products, Boston, USA
anti-Kaninchen IgG-HRPO	1:5000	<i>NEF 812</i> NEN Life Science Products, Boston, USA
anti-Ziege IgG-HRPO	1:5000	<i>sc-2056</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Protein A-Agarose		<i>sc-2001</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Protein G PLUS-Agarose		<i>sc-2002</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Protein A/G PLUS-Agarose		<i>sc-2003</i> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

#### 2.5.4. Zellkulturmedien, Medienzusätze, Antibiotika, Liganden

DMEM/Nut Mix F-12 1:1 (Glutamax)	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
McCoy's 5a	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
RPMI 1640	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
Nut Mix F-12 (HAM) (Glutamax)	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
FCS <sub>i</sub> (foetal calf serum-inactivated)	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
HS <sub>i</sub> (Horse serum-inactivated)	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
L-Glutamin	Biowhittaker, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin	Biowhittaker, Verviers, Belgien
EGF (epidermal growth factor)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IGF (insulin-like growth factor)	Calbiochem-Novabiochem, San Diego, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA Versen 1% (w/v) in PBS	Biochrom KG, Berlin
Trypsin-Versen	Biowhittaker, Verviers, Belgien
Blasticidin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hygromycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zeocin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fas Ligand (rekombinant, human) Kit	Alexis, San Diego, USA
TNF- $\alpha$ , rekombinantes Protein	Oncogene Research Products, Boston, USA

### 2.5.5. Plasmide

Die Numerierung und Bezeichnung der Vektoren und Konstrukte richtet sich nach der in der ASTA MEDICA AG / Abteilung TMB geführten gleichnamigen Oracel-Datenbank.

#### Vektoren:

#13	pBluescript SK (+)
#32	pFLAG
#48	pcDNA3.1/Hygro
#70	pcDNA6/V5-His B

#### Gene:

#42	pSV- $\beta$ -Galactosidase
-----	-----------------------------

#### Hefektoren:

#1	pPICZ B
#4	pPIC3.5K

#### Konstrukte – Labor2:

#8	pLex A-ras (Template für PCR)
#13	pSBC 2-c-raf-1-(AS1-149) (Template für PCR)
#34	pCM 184 FKBP12 (Template für PCR)
#43	pRS 413 lex A Activin-R-1 (Template für PCR)
#47	pPICZ-B-lacZ
#49	pPICZ-B-lacZ- $\Delta\alpha$
#51	pPICZ-B-lacZ- $\Delta\omega$
#53	pPICZ-B-lacZ- $\Delta\mu$
#55	pPICZ-B-lacZ- $\Delta\alpha$ -ras
#57	pPICZ-B-lacZ- $\Delta\omega$ -raf
#59	pPICZ-B-lacZ- $\Delta\alpha$ -Activin-R-1
#61	pPICZ-B-lacZ- $\Delta\omega$ -FKBP12
#64	pPIC3.5K-B-lacZ
#65	pPIC3.5K-B-lacZ- $\Delta\alpha$
#66	pPIC3.5K-B-lacZ- $\Delta\omega$
#67	pPIC3.5K-B-lacZ- $\Delta\mu$
#82	pFLAG-lacZ
#83	pFLAG-lacZ- $\Delta\alpha$ -ras-HIS
#84	pFLAG-lacZ- $\Delta\omega$ -raf-HIS
#85	pFLAG-lacZ- $\Delta\alpha$ -Activin-R-1-HIS
#86	pFLAG-lacZ- $\Delta\omega$ -FKBP12-HIS
#87	pFLAG-lacZ
#88	pFLAG-lacZ- $\Delta\alpha$
#89	pFLAG-lacZ- $\Delta\omega$
#90	pFLAG-lacZ- $\Delta\mu$
#91	pFLAG-lacZ- $\Delta\alpha$ -ras
#92	pFLAG-lacZ- $\Delta\omega$ -raf
#93	pFLAG-lacZ- $\Delta\alpha$ -Activin-R-1
#94	pFLAG-lacZ- $\Delta\omega$ -FKBP12

**Konstrukte – Labor3:**

#9 pcDNA3.1/Hygro-FLAG-Akt1- $\Delta$ PH-farn.  
 #44 pcDNA6-FLAG-Akt1- $\Delta$ PH-farn

**2.5.6. Oligonukleotide**

#351: 5'-GCGCGCGGTACCTCATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT-GACTGGGAAAA-3'  
 #352: 5'-GCATAACCACCACGCTCATCGATAATTTACCCGCCG-3'  
 #355: 5'-GCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAA-3'  
 #357: 5'-CGATATGCGGCCGCCAGCGGTGCACGGGTGAACTGAT-3'  
 #358: 5'-GCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAACG-3'  
 #359: 5'-CCATATGCGCAACTGTTGGGAAGGAACGACGGCCAGTGAATCCGTAA-3'  
 #360: 5'-GCTTATGCGCAGCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGAC-3'  
 #361: 5'-CGCCACCAATCCCCATATGGAAACCGTCGAT-3'  
 #362: 5'-GCTGCCACGTGATGACGGAATATAAGCTGGTGGTGGTG-3'  
 #364: 5'-GGGCACACGTGATGGGAGTGCAGAGGTGGAAACCA-3'  
 #366: 5'-GGCAGCACGTGATGGAGCACATACAGGGAGCTTGG-3'  
 #370: 5'-GCACGGGTACCGGGAGAGCACACACTTGCAGCTCAT-3'  
 #371: 5'-GGCGTGGTACCCTTCCAGTTTTAGAAAGCTCCACATCG-3'  
 #372: 5'-GGCACGGTACCCAAGCTTCAGGAACGTCCTCCGAGC-3'  
 #373: 5'-GCCTGCCACGTGATGAACTATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGC-3'  
 #374: 5'-GGCTGGGTACCGGATCTTCACGTCTTCTGCACGCTG-3'  
 #427: 5'-CTGTAGAAGCTTCACGTGGCCCAGCCGGCCGTC-3'  
 #444: 5'-CAAGCCCTCGAGTCAATGATGATGATGATGATGGGCGGCCGCTTTTTGACACC-3'  
 #535: 5'-GTATACCCCGTACGTCTTCCCG-3'  
 #536: 5'-GCGATAACGAGCTCCTGCACTGG-3'  
 #537: 5'-CGGACGCTCGAGATCATGATGATGATGATGATGTTTTTGGACACCAGACCAACTGG-3'  
 #539: 5'-CGGACGCTCGAGATCATGATGATGATGATGATGCAGCGGTGCACGGGTGAACTG-3'  
 #413: 5'-AAGGACGACGACGACCTGGAATTCGCTGACGGCCTCAAGAA-3'  
 #414: 5'-ATGCTAGCGCCACCATGGACTACAAGGACGACGACGAC-3'  
 #415: 5'-CTTGCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTAGAGGCGCTGCTGCTGGC-3'  
 #416: 5'-TATGTTTTAACTCACATGATCACGCACTGGTCTTGCTCTTCTTCTT-3'

**2.5.7. Kits**

Akt Kinase Assay Kit	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Big Dye <sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Boston, USA
Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit	Calbiochem-Novabiochem, San Diego, USA
Caspase-8 Assay Kit	Calbiochem-Novabiochem, San Diego, USA
Caspase-9 Colorimetric Assay Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim
Cytochrom C ELISA	Oncogene Research,
Expand <sup>™</sup> High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
first strand cDNA Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Fugene <sup>™</sup> Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Galacto-Light Plus <sup>™</sup> Kit	Tropix, Bedford, USA
High Pure <sup>™</sup> PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
NucleoBond <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Clontech, Palo Alto, USA

Protein Assay	BioRad Laboratories, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen, Hilden
RNeasy Kit	Quiagen, Hilden
Silica Spin Disc Plasmid DNA Mini Kit	Biometra, Göttingen
Western Blot Chemoluminescence Reagent	NEN Life Science Products, Boston, USA

## 2.6. Biologisches Material

### 2.6.1. Bakterienstämme

Empfängerorganismen	Genotyp
<i>E. coli</i> MC1061	<i>F araD139 Δ(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL (Str<sup>r</sup>) hsdR2 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) mcrA mcrB1</i>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F' endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>
<i>E. coli</i> ER2507	<i>F ara-14 leuB6 fhuA2 Δ(argF-lac)U169 lacY1 glnV44 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-5 Δ(malB) zjc::Tn5(Kan<sup>R</sup>) Δ(mcrC-mrr)<sub>HB101</sub></i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>F'::Tn10 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>

\* Alle 4 *E. coli* Stämme wurden bei New England Biolabs, Schwalbach/Ts bezogen.

### 2.6.2. Hefestämme

#### Stamm

<i>Pichia Pastoris</i> GS115	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Pichia Pastoris</i> SMD1168	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.6.3. Säugerzelllinien

NCI H440	ATCC Nr. HTB-177
A-549	ATCC Nr. CCL-185
SK-OV-3	ATCC Nr. HTB-77
MCF10A	ATCC Nr. CRL-10317



## 3. Methoden

### 3.1. Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1. Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen

##### *Stamm MC1061 / DH5 $\alpha$ / XL1-Blue*

Eine Übernachtskultur eines Einzelklons von *E. coli* MC1061, DH5 $\alpha$  bzw. XL1-Blue wird in 5ml TYM-Medium herangezogen. Mit 0,5ml dieser Kultur werden 500ml TYM-Medium in einem Fernbach-Kolben angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 kultiviert. Das Wachstum wird durch Zugabe von Brucheis und gleichzeitiger Kühlung im Eisbad abgestoppt. Anschließend werden die Zellen in einer Sorvall-Kühlzentrifuge im GSA-Rotor bei 6000rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Bei allen nachfolgenden Schritten ist auf Eis zu arbeiten, und es sollte darauf geachtet werden, dass die Geräte und Lösungen vorgekühlt sind.

Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 100ml TFB-1-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben beschrieben) werden die Zellen in 20ml TFB-2-Puffer resuspendiert, rasch aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C. Die Transformationsrate von ca.  $1 \times 10^7$  cfu/mg pUC19-DNA bleibt so über Monate erhalten.

<b>TYM-Medium</b>	2% (w:v)	Bacto-Tryptone
	0,5% (w:v)	Bacto Yeast-Extrakt
	10mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,1M	NaCl
		autoklavieren
<b>TFB-I-Medium</b>	15% (v:v)	Glycerin
	30mM	Kaliumacetat
	100mM	KCl
	10mM	CaCl <sub>2</sub>
	50mM	MnCl <sub>2</sub>
		MnCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub> : 2M Stammlösungen ansetzen (steril) und erst nach dem autoklavieren der Lösung zugeben
<b>TFB-II-Medium</b>	15% (v:v)	Glycerin
	10mM	Na-MOPS pH 7
	10mM	KCl
	75mM	CaCl <sub>2</sub>
		Lösung mit konzentrierter NaOH auf pH7 einstellen, autoklavieren

##### *Stamm ER2507*

Mit 1ml einer Übernachtskultur von *E. coli* ER2507 werden 100ml LB-Medium beimpft. Die Zellen wachsen bei 37°C und 220rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 ( $\pm 0,05$ ) heran (ca. 2,5-3h). Die Kultur wird sofort mit Brucheis und einem Eiswasserbad abgekühlt. Es folgt eine fünfminütige Zentrifugation der Zellen bei 6000rpm (GSA Rotor Sorvall, Zentrifuge) und

4°C. Das Zellpellet wird in 10ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und direkt für die Transformation eingesetzt.

<b>LB-Medium</b>	10g	Bacto-Tryptone
	5g	Bacto Yeast-Extract
	5,84g	NaCl
	15g	Agar (nur für Agarplatten)
	ad 1l	MilliQ
<b>TSS-Lösung (Transformation and Storage Solution)</b>	85%	LB-Medium
	10% (w:v)	Polyethylenglycol 8000
	5% (v:v)	DMSO
	50mM	MgCl <sub>2</sub>
		sterilfiltrieren und bei 4°C lagern; haltbar für ca. zwei Wochen bei 4°C

### 3.1.2. Bestimmung der Transformationsrate chemokompetenter *E. coli* Zellen

Die Qualität, d.h. die Anzahl zur DNA-Aufnahme befähigter kompetenter *E. coli*-Zellen, variiert in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren (Wachstum, Präparation, Lösungen usw.) von Präparation zu Präparation. Daher sollte nach jeder Präparation die 'cfu' (koloniebildende Einheit) bestimmt werden. Als Referenzplasmid wird pUC19 (2686bp) verwendet. Die Einheit 'cfu' bezieht sich auf 1µg Plasmid und 100µl kompetente Zellen.

Von einer bestimmten Plasmid-Verdünnung ausgehend werden 200µl kompetente Zellen mit 10µl dieser Lösung nach Standardprotokoll transformiert. Nachfolgend wird der Transformationsansatz in mehreren 10<sup>-1</sup>-Schritten in kaltem LB-Medium verdünnt (100µl Transformationsansatz + 900µl LB-Medium). Jeweils 100µl verschiedener Verdünnungsstufen werden mit Hilfe des Trigalski-Spatels auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen lassen sich die Platten auszählen und so die 'cfu' bestimmen.

### 3.1.3. Transformation von Plasmid DNA in chemokompetente *E. coli* Zellen

#### ***Stamm MC1061 / XL1-Blue***

Kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut. 120µl Bakteriensuspension werden mit 1µl Plasmid-DNA bzw. 20µl eines Ligationsansatzes vermischt und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt und dann sofort wieder auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wird auf eine mit Topagar beschichtete LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum pipettiert, mit dem Trigalski-Spatel gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### ***Stamm ER2507 / DH5α***

Kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut. 120µl Bakteriensuspension werden mit 1µl Plasmid-DNA bzw. 20µl eines Ligationsansatzes vermischt und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt und dann sofort wieder auf Eis gestellt. Zu dem Transformationsansatz werden 1ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz für mindestens 30min bei 37°C unter Agitation inkubiert. Die Bakteriensuspension wird auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum pipettiert, mit dem Trigalski-Spatel gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

**LB-Platten**

10g	Bacto-Tryptone
5g	Bacto Yeast-Extract
5,84g	NaCl
15g	Agar

- ad 1000ml (MilliQ), autoklavieren
- Zugabe von Ampicillin, wenn Lösung handwarm
- nach Antibiotikazugabe mischen und Platten gießen

**Low-Salt-LB-Platten**

10g	Bacto-Tryptone
5g	Bacto Yeast-Extract
5g	NaCl
15g	Agar

- ad 1000ml (MilliQ), autoklavieren
- Zugabe von Zeocin, wenn Lösung handwarm
- nach Antibiotikazugabe mischen und Platten gießen

**Stammlösungen Antibiotika**

Ampicillin	100mg/ml	<u>Endkonzentration:</u> 200µg/ml
Zeocin	100mg/ml	<u>Endkonzentration:</u> 25µg/ml

#### 3.1.4. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab, von 1,5ml Übernachtskultur, wird der Plasmidextraktionskit von Biometra nach den Vorschriften des Herstellers verwendet.

Für eine Plasmidisolierung im präparativen Maßstab, von 200ml Übernachtskultur, wird der „Maxiprep“ Plasmidextraktionskit von Clontech nach den Vorschriften des Herstellers verwendet.

#### 3.1.5. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Das Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgt nach Angaben des Enzymherstellers (New England Biolabs) in den jeweiligen Puffersystemen. In der Regel werden 1µg Plasmid DNA mit 10 Einheiten Enzym in einem solchen Volumen verdaut, dass die Glycerinkonzentration in dem Restriktionsansatz maximal 5% beträgt.

Der Ansatz wird 2-4h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und die Reaktion anschließend mit 5µl 3-fach Probenpuffer abgestoppt. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgt durch Elektrophorese in einem 0,5 bis 2%igen Agarose-Gel in 1x TAE Laufpuffer bei 8Volt/cm Gellänge.

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wird der QIAquick® Gelextraktionskit der Firma Quiagen verwendet. Es wird entsprechend dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

**TAE Puffer 50X**

2M	Tris-Acetat
50mM	EDTA

pH8 mit konzentrierter Essigsäure einstellen  
vor Gebrauch 1:50 mit MilliQ verdünnen und  
0,5mg/l Ethidiumbromid zufügen

<b>3 x DNA-Probenpuffer</b>	100mM	Mercaptoethanol
	10mM	EDTA
	0,05%	SDS
	0,05%	Bromphenolblau
	60%	Sacharose

### 3.1.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Vor Einklonierung eines DNA-Fragments in ein Plasmid ist es zweckmäßig, die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA zu entfernen, um eine Religation der Vektorenden zu vermeiden, wodurch es zu einer geringeren Ausbeute an rekombinanten Plasmiden kommt. Dies ist besonders dann möglich, wenn die Subklonierung mit nur einem Restriktionsenzym durchgeführt wird.

Die linearisierte Vektor-DNA wird 30min mit 1Einheit/ $\mu$ g DNA alkalischer Phosphatase (CIP, „calf intestinal alkaline phosphatase“, Roche Biochemicals) im Reaktionspuffer bei 37°C inkubiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem mit restriktionsverdauter DNA.

### 3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen. Die Reaktion ist abhängig von  $Mg^{2+}$  Ionen und ATP. In einem Ligationsansatz werden der Vektor und das DNA-Insert in einem molaren Verhältnis von ca. 1:4 eingesetzt. Die Ligation erfolgt bei 15°C über Nacht in einem möglichst kleinen Volumen (15-30 $\mu$ l) mit dem vom Hersteller gelieferten Ligasepuffer und einer Einheit an T4-Ligase.

### 3.1.8. „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgt in einem Perkin Elmer Gene Amp<sup>®</sup> 9700 Thermocycler. Das Reaktionsvolumen beträgt 50 $\mu$ l bestehend aus der DNA-Matrize, 5 Einheiten Pfu DNA Polymerase, Pfu Polymerasepuffer, je 20-100pmol der entsprechenden Primer-Oligonukleotide und je 200 $\mu$ M Desoxyribonukleotide.

<b>Reaktionsansatz PCR</b>	10mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	50mM	KCl
	1-4mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,2-1 $\mu$ M	Primer-Oligonukleotid
	0,2-1 $\mu$ M	Primer-Oligonukleotid
	200 $\mu$ M	DNTPs
	10ng/ $\mu$ l	Matrizen-DNA
	5 Einheiten	Pfu

Die Amplifikation der Matrizen-DNA erfolgt durch mehrere Zyklen einer bestimmten Temperaturabfolge. In einem einmaligen, ersten Denaturierungsschritt von 1-5min. bei 94°C wird die doppelsträngige DNA einzelsträngig gemacht. Anschließend folgen ein weiterer, immer wiederkehrender Denaturierungsschritt bei 94°C für 30s bis 1min, ein Hybridisierungsschritt für 30s bis 1min, bei dem die Primer-Oligonukleotide an die Matrizen-DNA binden und ein Polymerisationsschritt von 30s bis 2min oder länger. Die Temperatur bei der die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die Matrize stattfindet ist von dem Schmelzpunkt des Oligonukleotids abhängig und muss deshalb individuell festgelegt werden. Die Strangverlängerung erfolgt bei 72°C und die Länge dieses Schrittes richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, üblicherweise 1min pro kb.

<b>Protokoll PCR</b>	Initiationssequenz	1-5min 94°C
	Denaturierung	30s-1min 94°C
	Hybridisierung	30s-1min X °C
	Strangverlängerung	30s-2min 72°C
		25 oder mehr Zyklen
	Finale Verlängerung	6min 72°C

Die Amplifikation von längeren DNA-Sequenzen erfolgt mit Hilfe des Expand™ High Fidelity PCR Systems. Als DNA Polymerase wird hierbei eine Mischung aus Taq DNA Polymerase und Pwo DNA Polymerase verwendet. Die Pwo DNA Polymerase besitzt 3'-5' Exonuclease Aktivität zum Korrekturlesen. Es wird der selbe Reaktionsansatz wie oben beschrieben verwendet (Ausnahme: 3 Einheiten des DNA Polymerase Enzym-Mixes anstelle der Pfu DNA Polymerase). Die Strangverlängerung erfolgt bei 70°C für Fragmente von 3kb. Das Protokoll umfasst zwei unterschiedliche Unterprogramme. Während der ersten zehn Amplifikationszyklen erfolgt die Strangverlängerung für 2 Minuten, für die weiteren 15-20 Zyklen verlängert sich diese Zeit um jeweils 5 Sekunden.

<b>Protokoll PCR</b>	Initiationssequenz	1-5min 94°C
	Denaturierung	30s 94°C
	Hybridisierung	30s X °C
	Strangverlängerung	2min 70°C
		10 Zyklen
	Denaturierung	30s 94°C
	Hybridisierung	30s X °C
	Strangverlängerung	2min + 5sec Verlängerung für jeden Zyklus 70°C
		15-20 Zyklen
	Finale Verlängerung	6min 72°C

### 3.1.9. Sequenzanalyse von DNA

Die Aufreinigung der zur Sequenzierung eingesetzten DNA erfolgt durch Präparation mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen Kat. Nr. 27106) aus einer Übernachtskultur nach den Angaben des Herstellers.

Die DNA Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin Elmer) nach dem Prinzip der Dideoxy-Abbruchmethode von F. Sanger. Dabei wird die zu sequenzierende DNA neben den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) mit einer thermostabilen DNA Polymerase und den vier Dideoxyribonukleotiden versetzt. Diese enthalten jeweils am Heterozyklenanteil einen Basen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff. Dadurch werden die durch Termination der Polymerase-Reaktion erzeugten DNA-Fragmente spezifisch markiert und können aufgrund ihrer Fluoreszenz photometrisch detektiert werden. Die Verlängerungs- und Terminationsreaktionen werden bei Verwendung des BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits in einem Schritt am GeneAmp® 9700 Thermocycler (Perkin Elmer) durchgeführt.

<b>Reaktionsansatz</b>	4 $\mu$ l	BigDye <sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Mix
	200ng	Plasmid DNA
	1,5mM	Oligonukleotid Primer
	ad 20 $\mu$ l	HPLC-H <sub>2</sub> O

Um freie Fluoreszenz-markierte Nukleotide vom Reaktionsansatz abzutrennen, werden Centri Sep<sup>®</sup> Säulen (Perkin-Elmer) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Trennung erfolgt nach dem Prinzip der Gelfiltration. Dabei lässt man das Säulenmaterial durch Zugabe von 750 $\mu$ l HPLC-H<sub>2</sub>O für 30min quellen. Die überschüssige Flüssigkeit wird durch Zentrifugation bei 3000rpm für 2min in einer Mikrozentrifuge entfernt. Der Reaktionsansatz wird dann vorsichtig auf die so vorbereitete Säule gegeben, erneut zentrifugiert und der Durchfluss für den Probenauftrag im ABI Prism<sup>®</sup>310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) verwendet.

Dazu werden 4 $\mu$ l des Durchflusses mit 20 $\mu$ l TSR Puffer (Perkin Elmer) versetzt. Der Sequenzierungsansatz wird für 2min bei 96°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Der Ansatz wird in ein Sequenziergefäß überführt und in das automatische Ladegerät des Sequenziergerätes gestellt. Der gesamte Prozess von der Kapillarbefüllung, Probeninjektion, Proben-Auftrennung und Detektion ist vollständig automatisiert.

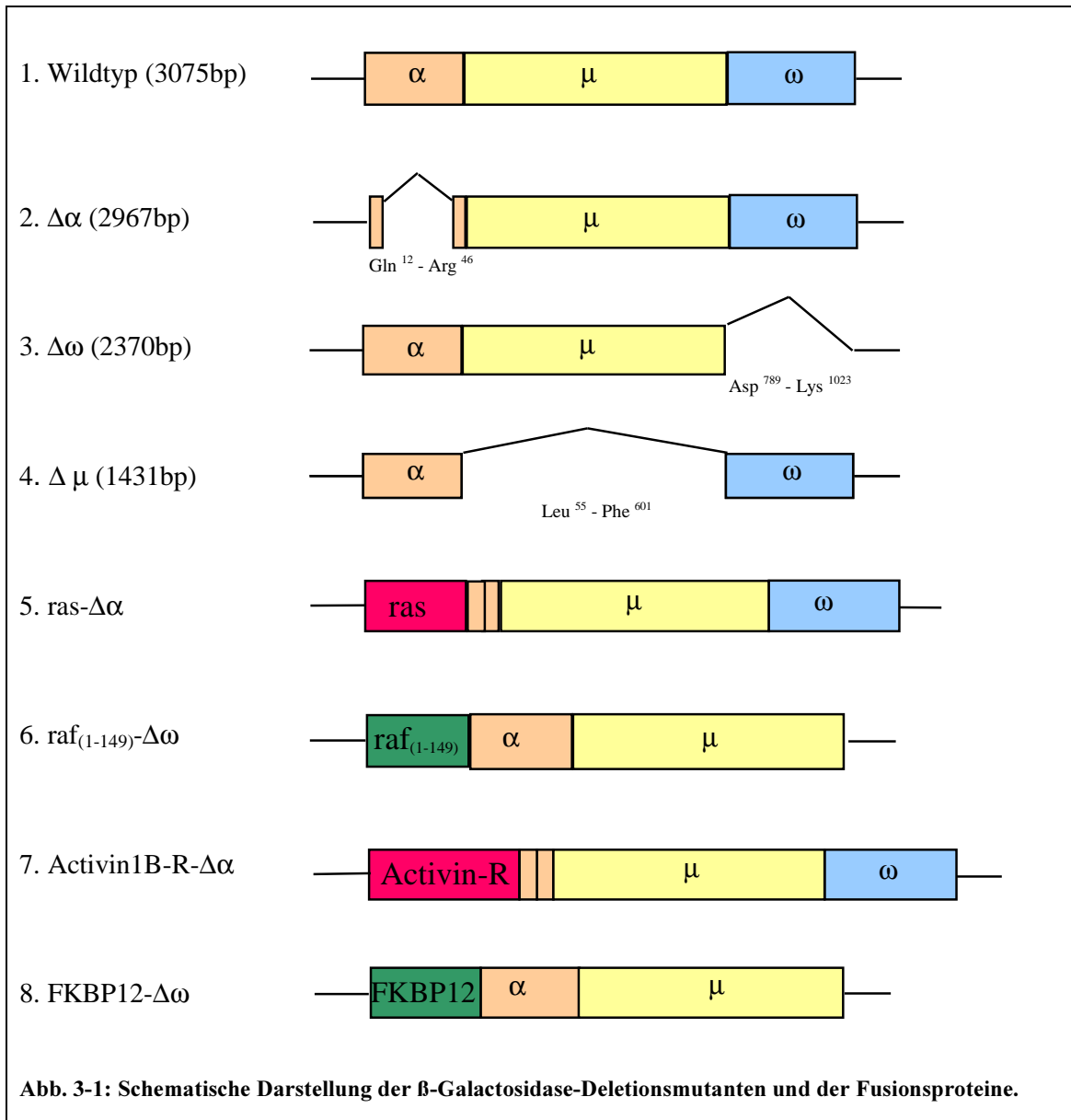
Ebenso wie bei klassischen Methoden zur DNA Analytik werden auch die Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür werden Polymergefüllte Glaskapillaren benutzt. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe passieren die Fragmente einen bestimmten Bereich des Systems, in dem der Laserstrahl fokussiert ist. Das zeitgleich emittierte Licht wird über Spiegelsysteme zur Detektionseinheit zurückgestrahlt. Das durch die Fluoreszenzfarbstoffe entsandte Emissionslicht wird durch ein Gitter, einen sogenannten Spektrographen, in seine Spektralfarben zerlegt. Die zeitgleiche Detektion der Spektralfarben erfolgt mit dem hochauflösenden Pixelfeld einer CCD-Kamera, die Erfassung und Verarbeitung der erhobenen Daten mit Hilfe eines Computers und des entsprechenden Auswertungsprogramms.

### 3.1.10. Klonierung verschiedener Deletionsmutanten der $\beta$ -Galactosidase und der Fusionsproteine

Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase ist in seiner aktiven Form aus vier identischen Untereinheiten von jeweils 116kDa aufgebaut. Aus *E. coli* Bakterien konnten Deletionsmutanten der  $\beta$ -Galaktosidase isoliert werden, die kein aktives Enzym bilden können. Durch die Zugabe des deletierten Abschnitts der  $\beta$ -Galaktosidase zu diesen Deletionsmutanten lässt sich die Aktivität des Komplexes zum großen Teil aber rekonstituieren, ein Vorgang, der in der Literatur als  $\alpha$ -Komplementation beschrieben ist. Die N- und die C-terminalen Regionen der  $\beta$ -Galaktosidase, die bei der  $\alpha$ -Komplementation beteiligt sind, werden als  $\alpha$ - bzw.  $\omega$ - Region bezeichnet, das Zentralpeptid als  $\mu$ -Region.

Um ein System zu entwickeln, das Protein-Protein-Interaktionen detektierbar macht, müssen Deletionsmutanten gefunden werden, die alleine nur sehr schwach miteinander interagieren können. Erst durch die Fusion dieser Deletionsmutanten mit einem interagierenden Proteinpärchen soll es zur Komplementation und damit zu  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kommen. Abbildung 3-1 zeigt die schematische Darstellung der Deletionsmutanten und der Fusionsproteine. Das Konstrukt  $\Delta\alpha$  entspricht der natürlich vorkommenden Mutation M15 und kann aufgrund des Vorhandenseins der zentralen  $\mu$  Domäne die Deletionsmutante  $\Delta\omega$  nur sehr schwach komplementieren. Deletionsmutante  $\Delta\mu$  sollte in der Lage sein, sowohl  $\Delta\alpha$  als auch  $\Delta\omega$  zu komplementieren und dient daher als Kontrolle. Durch die Fusion der nicht-interagierenden Deletionsmutanten mit den beiden interagierenden Proteinpärchen ras-

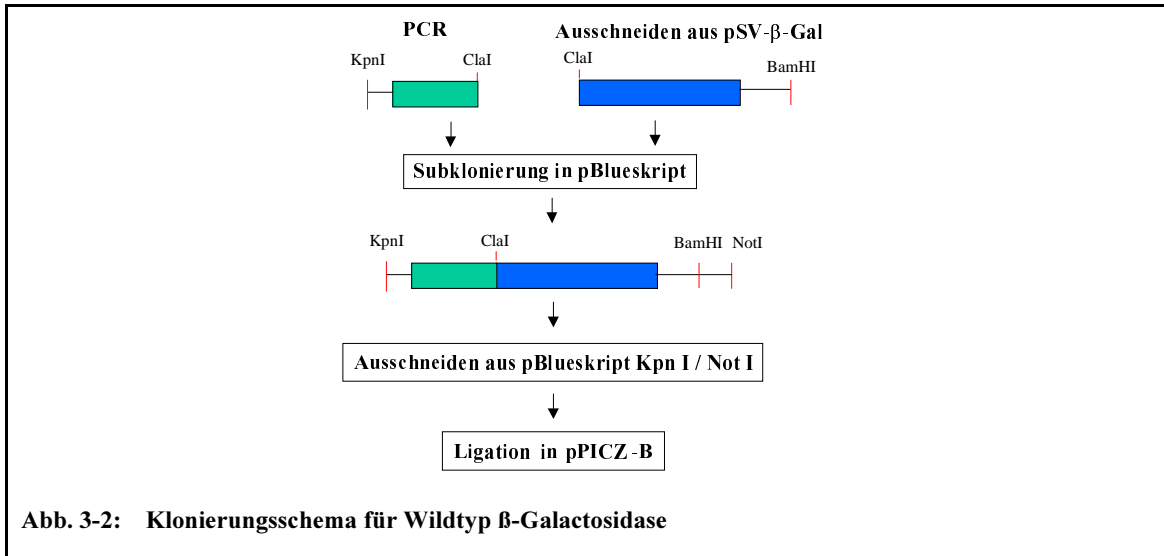
raf<sub>(Interaktionsdomäne)</sub> sowie Activin-1B-Rezeptor-FKBP12 soll eine Komplementation ermöglicht und somit eine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität messbar gemacht werden. Die Struktur der Deletionsmutanten wurde aus der Literatur übernommen [62].



Das Konstrukt Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase wurde durch PCR mit den Primern #351 und #352 über die Schnittstellen Kpn I / Cla I sowie Verdau von pSV- $\beta$ -Galactosidase mit Cla I / BamH I und anschließende Subklonierung der beiden Fragmente in Kpn I / BamH I geöffneten pBlueskript-Vektor erstellt (siehe Abbildung 3-2). Das fertige Konstrukt konnte nun durch Verdau mit Kpn I / Not I aus pBlueskript ausgeschnitten und in die entsprechenden *Pichia pastoris*-Expressionsvektoren kloniert werden.

Zur Erstellung der Deletionsmutanten wurden weitere PCR-Reaktionen mit den Primern #355 und #357 ( $\Delta\omega$ -Mutante), #358 und #359 ( $\Delta\alpha$ -Mutante), sowie #360 und #361 ( $\Delta\mu$ -Mutante) mit dem Vektor pSV- $\beta$ -Galactosidase als Template durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt, Eco47 III / Not I, Hind III / Fsp I bzw. Fsp I / Nde I verdaut und in das jeweils ebenso geöffnete Konstrukt pPICZ-B-lacZ (#47) kloniert. Zur Erstellung der Fusionsproteine

erfolgten erneut PCR-Reaktionen mit den Primern #362 und #370 (ras), #366 und #372 (raf Interaktionsdomäne AS1-149), #364 und #371 (FKBP12) sowie #373 und #374 (Activin-R) und den Konstrukten (Labor2) #8, #13, #34 und #43 als Templates. Wiederum wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert, Pml I / Kpn I verdaut und wie in Abbildung 3-1 beschrieben N-terminal im Leserahmen vor die entsprechende Deletionsmutante im *Pichia pastoris*-Expressionsvektor kloniert. Die Richtigkeit der Sequenzen der Konstrukte wurde mittels Fluoreszenz-Didesoxy-Sequenzanalyse kontrolliert. Zur Umklonierung der Deletionsmutanten und der Fusionsproteine in andere *Pichia pastoris*-Expressionsvektoren wurde das jeweilige Konstrukt Pml I / Not I verdaut und in den ebenso geöffneten Vektor kloniert.

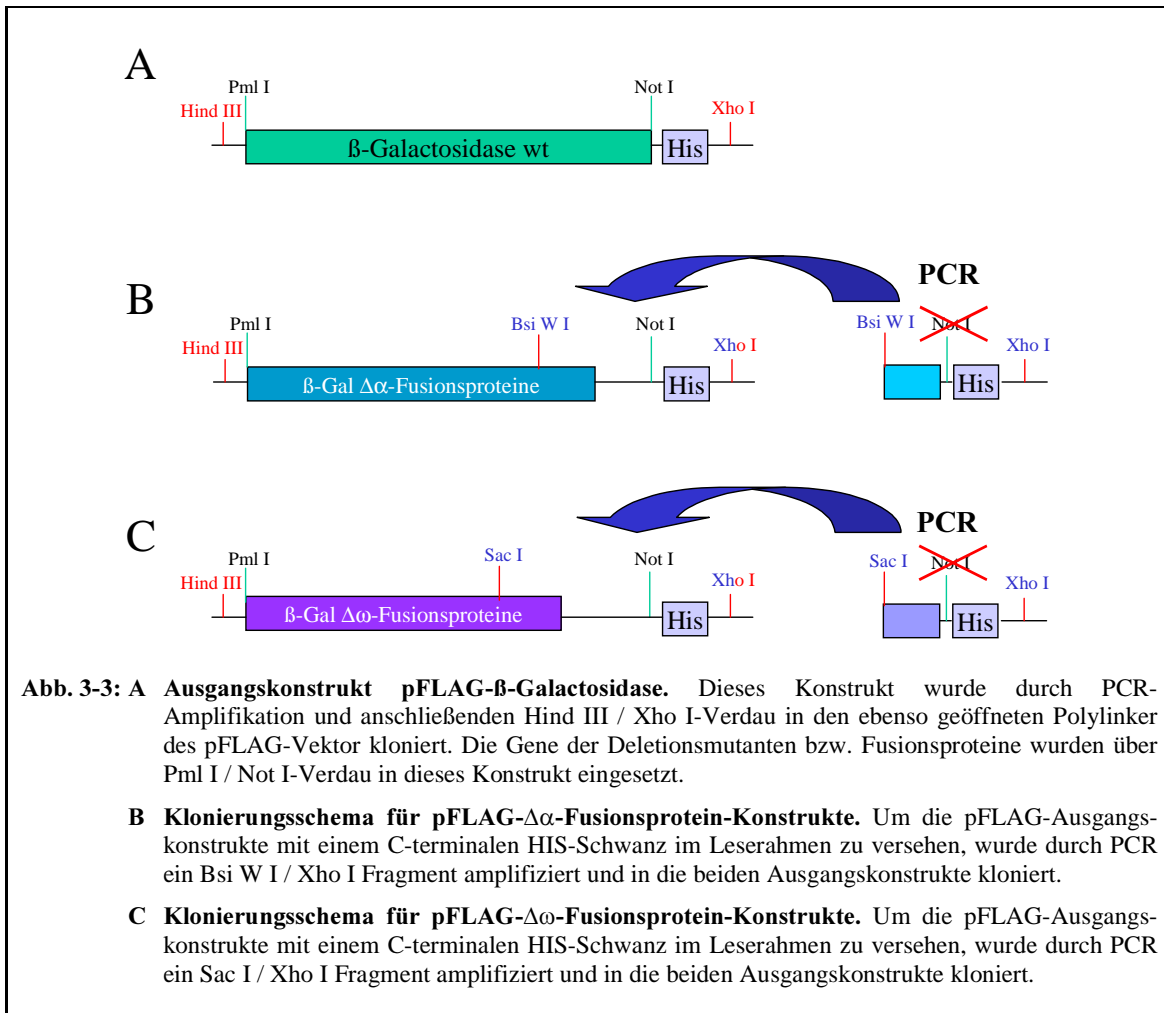


**Abb. 3-2: Klonierungsschema für Wildtyp β-Galactosidase**

Um Wildtyp β-Galactosidase, die Deletionsmutanten und die Fusionsproteine in *E. coli* exprimieren zu können, mussten die Konstrukte in Vektor #32 (pFLAG) umkloniert werden. Hierzu wurde mit dem Expand™ High Fidelity PCR Kit, den Primern #427 und #444 sowie dem Konstrukt pPICZ-B-lacZ (#47) als Template ein Fragment amplifiziert, das durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I in den ebenso geöffneten Polylinker des pFLAG-Vektor kloniert werden konnte. Dieses Konstrukt (Abb. 3-3 A) war nun der Ausgangspunkt für die Klonierung der Deletionsmutanten- und Fusionsprotein-Konstrukte. Diese wurden zunächst mit den Restriktionsendonukleasen Pml I / Not I aus den Hefe-Expressionsvektoren ausgeschnitten und anschließend im Leserahmen in das ebenfalls Pml I / Not I geöffnete Konstrukt aus Abbildung 3-3 A kloniert.

Da die Fusionsproteine zu Detektions- und Aufreinigungszwecken einen Histidin(6x)-Schwanz im Leserahmen enthalten sollten, wurden zwei weitere PCR-Ansätze durchgeführt. Für die Δα-Fusionsproteine wurde mit den Oligos #535 und #537 und pPICZ-B-Δα (Konstrukt #49) als Template mit Hilfe der Pfu Polymerase ein PCR-Fragment amplifiziert, das nach Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit Bsi W I / Xho I verdaut und C-terminal in die vorher erstellten pFLAG- Δα-Fusionsprotein-Konstrukte kloniert wurde (siehe Abbildung 3-3 B). Für die Δω-Fusionsproteine wurde mit den Oligos #536 und #539 und pPICZ-B-Δω (Konstrukt #51) als Template mit Hilfe der Pfu Polymerase ein PCR-Fragment amplifiziert, das nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Aufreinigung Sac I / Xho I verdaut und in die vorher erstellten pFLAG-Δω-Fusionsprotein-Konstrukte kloniert wurde (siehe Abbildung 3-3 C). Die erfolgreiche Klonierung konnte im Restriktionsverdau durch die Deletion der Not I-Schnittstelle überprüft werden. Abschließend wurde die Richtigkeit der Sequenzen aller erstellter Konstrukte durch Sequenzanalyse überprüft.





### 3.1.11. Klonierung eines konstitutiv aktiven PKB/Akt-Derivats

Konstitutive Aktivierung von PKB/Akt wird durch Membraninsertion und anschließende Phosphorylierung erreicht. Dazu wurden bislang PKB/Akt-Konstrukte verwendet, die eine N-terminale Myrestylierungssequenz besitzen [162]. Da es sich bei Myrestylierung jedoch um einen irreversiblen kovalenten Prozess handelt, ist nicht sichergestellt, dass dieses Konstrukt auch von der Membran dislozieren und somit zu seinen zellulären Zielproteinen gelangen kann. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde ein konstitutiv-aktives Derivat von PKB/Akt mit deletierter PH-Domäne (Aminosäuren 1-106) entwickelt, das neben einer N-terminalen FLAG-Markierung auch eine C-terminale Farnesylierungssequenz gefolgt von einem polybasischen Schwanz enthält [163]. Die Farnesylierung ist eine reversible Modifikation, da sie durch Farnesylesterasen gespalten werden kann.

Zur Klonierung des Konstrukts wurde zunächst Gesamt-RNA aus MCF10A Zellen mit Hilfe des RNeasy Kit der Firma Qiagen (Hilden, Germany) isoliert und diese anschließend unter Benutzung des first strand cDNA Kit von Roche Diagnostics (Indianapolis, IN) in cDNA translatiert. In zwei PCR Ansätzen wurde mit Hilfe der Primer Paare #413 und #415 bzw. #414 und #416 ein Produkt amplifiziert, das für das oben beschriebene Konstrukt kodiert. Dieses PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen Nhe I und Pme I in den Polylinker der Vektoren pcDNA 3.1/Hygro (#48) bzw. pcDNA6-Blasticidin (#70) kloniert.

## 3.2. Zellbiologische Methoden - Hefen

### 3.2.1. Verwendete Hefestämme

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Phänotyp</i>
Pichia Pastoris GS115	<i>his4</i>	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup>
Pichia Pastoris SMD1168	<i>his4 ura3 pep4::URA3</i>	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup> Protease-defizient

Das methylotrophe Hefesystem *Pichia Pastoris* wird als Expressionssystem genutzt, mit dem sich hohe Mengen rekombinanten Proteins herstellen lassen. Ein großer Vorteil dieses Hefesystems gegenüber prokaryontischer Expression besteht in seiner eukaryontischen Proteinprozessierung, Modifikation und Faltung. Das Expressionsplasmid, das das Gen des zu exprimierenden Proteins trägt, wird stabil in den Hefestamm eingebracht und integriert hinter dem starken AOX1 (Alkohol Oxidase 1) Promotor, der eine induzierbare Proteinexpression ermöglicht.

### 3.2.2. Stabile Hefetransformation von *Pichia Pastoris* mittels LiCl-Methode

Diese Methode ist eine Variation der Lithiumacetat-Transformation von *S. cerevisiae* und erreicht eine Transformationseffizienz von  $10^2$  bis  $10^3$  cfu/ $\mu$ g linearisierter DNA.

<b>YPD-Medium</b>	1% (w:v)	Yeast-Extrakt
	2% (w:v)	Bacto-Peptide - ad 900ml mit MilliQ - autoklavieren - Zugabe von 100ml Glucose direkt vor Benutzung
	20% (w:v)	Glucose - autoklavieren
<b>YPD-Platten</b>	1% (w:v)	Yeast-Extrakt
	2% (w:v)	Bacto-Peptide
	2% (w:v)	Glucose - ad 1000ml mit MilliQ - autoklavieren
	100 $\mu$ g/ml	Zeocin, sobald Medium handwarm

Zunächst wird das zu transformierende Expressionsplasmid mit der Restriktionsendonuklease Pme I linearisiert. Nach 2h wird das Enzym durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Über Nacht wird nun eine 50ml YPD Kultur mit dem zu transformierenden *Pichia Pastoris* Stamm angeimpft und unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird die OD<sub>600</sub> bestimmt und die Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6 verdünnt. Nach weiterer Inkubation für eine Stunde wird das Wachstum bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,9 gestoppt, indem die Kultur zentrifugiert wird (1500g / 4°C / 5min). Das Zellpellet wird nun mit 25ml aq. dest. (steril) gewaschen und erneut zentrifugiert (wie oben). Das Zellpellet wird dieses mal in 1ml 100mM LiCl-Lösung (steril) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14000rpm Tischzentrifuge / 4°C / 5min) werden die Zellen in 400 $\mu$ l 100mM LiCl resuspendiert.

Je Transformationsansatz werden 50 $\mu$ l LiCl-kompetenter Zellen mit 10 $\mu$ g linearisierter DNA vermischt und für 30min bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für 25min, ehe die Zellen erneut pelletiert (8000rpm / 4°C / 5min) und schließlich nach Resuspendierung in 1ml YPD Medium für 4h bei 30°C geschüttelt werden. Nach dieser Zeit werden jeweils 150 $\mu$ l des Gesamtansatzes auf 20ml-YPD-Platten mit 100 $\mu$ g/ $\mu$ l Zeocin

ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert, bis sich Kolonien geformt haben, die auf Expression des gewünschten Proteins überprüft werden können.

### 3.2.3. Stabile Hefetransformation von *Pichia Pastoris* mittels Elektroporation

Diese Methode der Hefetransformation weist im Vergleich zur LiCl-Transformation eine deutlich höhere Transformationseffizienz von  $10^3$  bis  $10^4$  cfu/ $\mu$ g linearisierter DNA auf.

Zunächst wird erneut das zu transformierende Expressionsplasmid mit der Restriktionsendonuklease Pme I linearisiert. Nach 2h wird das Enzym durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Die einzelnen DNA-Ansätze werden mit S-200-Säulen von Amersham Pharmacia entsalzt, um einen Kurzschluss bei der Elektroporation zu verhindern.

Über Nacht wird eine 5ml YPD Vorkultur mit dem zu transformierenden *Pichia Pastoris* Stamm angeimpft und unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Start-OD<sub>600</sub> der Hauptkultur wird so berechnet, dass die Kultur zur geplanten Zeit eine OD<sub>600</sub> von 1,4 aufweist:

$$\text{Start-OD} = 1,4 \times (0,5)^{\text{Verdopplungen}} \quad [1 \text{ Verdopplung dauert 2 Stunden}]$$

125ml YPD Medium werden mit der berechneten Menge an Hefezellen angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen der OD<sub>600</sub> von 1,4 werden die Zellen zentrifugiert (1500g / 4°C / 5min), mit 125ml aq. dest. (steril/kalt) gewaschen, wiederum zentrifugiert (wie oben) und erneut mit 125ml aq. dest. (steril/kalt) gewaschen. Die Zellen werden pelletiert, in 10ml eiskalter 1M Sorbitol-Lösung resuspendiert, ein weiteres mal zentrifugiert und schließlich in 1ml eiskalter 1M Sorbitol-Lösung aufgenommen. 80 $\mu$ l der Zellsuspension wird sofort mit 10 $\mu$ g linearisierter DNA in vorgekühlte 0,2cm Elektroporationsküvetten (Eppendorf) gegeben und 5min auf Eis inkubiert. Mit den Einstellungen 1500V / 25 $\mu$ F / 200 $\Omega$  am BioRad GenePulser wird ein Puls auf die Zellen gegeben, wobei  $\tau$  zwischen 6 und 8msec. betragen sollte. Nach dem Puls wird sofort 1ml 1M Sorbitol-Lösung (eiskalt) zugegeben und die Zellsuspension für 30min bei 30°C ohne Schütteln inkubiert, ehe nach einem weiteren Inkubationsschritt von 2h bei 30°C unter Schütteln unterschiedliche Mengen (50, 100, 200 $\mu$ l) der Transformanden auf Selektionsplatten ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert werden, bis sich Kolonien geformt haben, die auf Expression des gewünschten Proteins überprüft werden können.

### 3.2.4. Proteinexpression der rekombinanten *Pichia Pastoris* Stämme

Um zu überprüfen, ob Klone das gewünschte Protein exprimieren, werden im analytischen Maßstab 5ml BMMY-Kulturen der zu überprüfenden Klone in 50ml Kolben angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wird über Nacht bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 2-6 geschüttelt (Zellen im logarithmischen Wachstum), anschließend auf eine OD<sub>600</sub> von 1 in BMMY verdünnt und mit 0,5% Methanol induziert. Nach 6-8h Induktion wird der Klon auf Proteinexpression untersucht.

<b>BMMY-Medium</b>	1% (w:v)	Yeast-Extrakt
	2% (w:v)	Bacto-Peptide
	1,34%	Yeast Nitrogen Base
		- ad 900ml mit MilliQ – autoklavieren
	100ml	1M Kaliumphosphat, pH 6,0
	2ml	Biotin (20mg/100ml – sterilfiltriert)

Um größere Mengen des Proteins aus den positiven Klonen zu präparieren, werden im präparativen Maßstab 5ml BMMY-Vorkulturen der Klone in 50ml Kolben angeimpft und

über Nacht bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 2-6 inkubiert (Zellen im logarithmischen Wachstum). Mit dieser Vorkultur wird anschließend die Hauptkultur von 100ml in 500ml Kolben mit Schikanen (zur optimalen Durchmischung der Kultur mit Sauerstoff) angeimpft (OD<sub>600</sub> von 1) und mit 0,5% Methanol induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird eine Probe genommen und auf Proteinexpression untersucht. Zur Induktion wird alle 24h frisches Methanol (0,5%) zugegeben.

### 3.2.5. Aufschluss von Hefen mittels Glas bzw. Zirkonium Chlorid-Kügelchen

Zum Aufschluss der Hefezellen werden diese zunächst pelletiert. Das Zellpellet wird in 50-200µl Aufschlusspuffer (0,1M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 0,1M MgCl<sub>2</sub>) aufgenommen, wobei eine sehr konzentrierte Zellsuspension entsteht. Nach Zugabe von 5-10µl des Protease Inhibitor Cocktails wird  $\frac{1}{3}$  -  $\frac{1}{2}$  Volumen Glas-Kügelchen (Durchmesser 200µm) zu der Zellsuspension gegeben. Der Ansatz wird nun 30min im Kühlraum bei 4°C auf einem Schüttler mit Aufsatz gevortext. Nach anschließender Zentrifugation lässt sich die Proteinlösung mit der Pipette abziehen und analysieren.

Um die Aufschlusseffizienz zu steigern, können anstelle der Glas-Kügelchen auch Zirkonium Chlorid-Kügelchen ([www.muehlmeier.de](http://www.muehlmeier.de)) verwendet werden. Diese weisen eine sehr hohe Dichte auf und besitzen daher beim Aufschluss eine höhere kinetische Energie als Glas-Kügelchen.

## 3.3. Zellbiologische Methoden - eukaryontische Zelllinien

### 3.3.1. Verwendete Zelllinien

**NCI H440 Zellen** ATCC Nr. **HTB-177** / Cancer Res. **46**:798-806 (1986)

NCI H460 Zellen sind humane Lungenkarzinomzellen und wurden aus der Pleuralflüssigkeit eines Mannes mit non-small cell Lungenkrebs vor Behandlung gewonnen. Die epitheliale Tumorzelllinie wächst adhärent, besitzt Wildtyp p53 mit ähnlicher Expressionsrate im Vergleich zu Normalgewebe und weist kaum genomische Abnormalitäten auf.

<b>NCI H460</b>	90%	RPMI 1640
	10% (v:v)	FCSi
	1% (v:v)	200mM L-Glutamin
	100µg/ml	Penicillin
	100µg/ml	Streptomycin

**A-549 Zellen** ATCC Nr. **CCL-185** / J. Natl. Cancer Inst. **51**:1417-1423 (1973)

A-549 Zellen sind humane Lungenkarzinomzellen, die aus non-small cell Lungenkrebsgewebe eines kaukasischen Mannes gewonnen wurden. Die epitheliale Tumorzelllinie wächst adhärent und besitzt einen hypertriploiden Chromosomensatz.

<b>A-549</b>	90%	Nut-Mix-F12
	10% (v:v)	FCSi
	1% (v:v)	200 mM L-Glutamin
	100µg/ml	Penicillin
	100µg/ml	Streptomycin

**SK-OV-3 Zellen** ATCC Nr. **HTB-77** / J. Natl. Cancer Inst. **58**: 209-214 (1977)

SK-OV-3 Zellen sind humane Ovaradenokarzinomzellen. Die Zelllinie wächst adhärent und weist Resistenz gegenüber Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  sowie einige Zytostatika auf.

<b>SK-OV-3</b>	90%	Mc Coy's 5A Medium
	10% (v:v)	FCS <sub>i</sub>
	1% (v:v)	200 mM L-Glutamin
	100 $\mu$ g/ml	Penicillin
	100 $\mu$ g/ml	Streptomycin

**MCF-10A Zellen** ATCC Nr. **CRL-10317** / Cancer Res. **50**: 6087-6094 (1990)

MCF-10A Zellen wurden aus fibrozystischem Gewebe der Brustdrüse isoliert. Die nicht tumorigene, epitheliale Zelllinie wächst adhärent.

<b>MCF-10A</b>	95%	Ham's F12 + DMEM (1:1)
	5% (v:v)	Hs <sub>i</sub>
	1% (v:v)	200 mM L-Glutamin
	100 $\mu$ g/ml	Penicillin
	100 $\mu$ g/ml	Streptomycin
	20ng/ml	EGF
	0.01mg/ml	Insulin
500ng/ml	Hydrocortison	

## 3.3.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Das Auftauen von Säugerzellen aus der Kryokonservierung erfolgt durch schnelle Erwärmung des Kryoröhrchens im 37°C-Wasserbad. Sobald die Zellen aufgetaut sind, werden sie sofort in ein 15ml Falconröhrchen mit Kulturmedium überführt und bei 2000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird das Einfriermedium abgesaugt, um das toxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wird in 5ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine T25 Zellkulturflasche überführt. Die Zellen werden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag je nach Zustand verdünnt bzw. ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zum Einfrieren werden Zellen aus einer subkonfluenten T75-Zellkulturflasche abgelöst, in frischem Kulturmedium aufgenommen und in ein 50ml Falconröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 5min. bei 2000rpm (Heraeus, Megafuge 1.0R) wird das Medium entfernt und die Zellen in 3ml Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium besteht aus 95% Serum (je nach Zelllinie FCS<sub>i</sub> oder NCS<sub>i</sub>) und 5% DMSO. Je 1ml Zellsuspension wird in Einfriereröhrchen (Nunc) verteilt. Die Röhrchen werden in einen Styroporbehälter gestellt und zwei bis drei Tage bei -80°C gelagert. Das Styroporgestell sorgt dafür, dass die Abkühlung allmählich geschieht. Nach dem Durchfrieren werden die Zellen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

## 3.3.3. Subkultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zelllinien werden in Plastikflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Zweimal wöchentlich erfolgt eine Verdünnung der Zellen. Die entsprechende Verdünnung ist abhängig von der jeweiligen Zelllinie und beträgt zwischen 1:3 und 1:10.

Das Medium wird dazu abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend werden die Zellen mit Trypsin Versene Lösung bedeckt. Die Gewebekulturflasche wird für etwa 3 Minuten in horizontaler Lage belassen und anschließend durch kräftiges Abklopfen das Ablösen der Zellen beschleunigt. Die abgelösten Zellen werden in frischem Kulturmedium aufgenommen und in ein 15ml Falconröhrchen überführt. Das Serum in dem Kulturmedium enthält Inhibitoren, welche die Aktivität des Trypsins hemmen und dadurch die Reaktion abstoppen. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 2000rpm und 4°C wird die Lösung abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. In der jeweils erforderlichen Verdünnung werden die Zellen in neue Gewebekulturflaschen ausgesetzt.

<b>PBS (phosphate buffered saline)</b>	137mM	NaCl
<b>Seromed Kat. # L1825</b>	2,7mM	KCL
	4,3mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,4mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		PH 7,4
<b>Trypsin Versene (EDTA) Mix</b>	0,5g/l	Trypsin
<b>Biowhittaker Kat. #17-161 E</b>	0,2g/l	EDTA

### 3.3.4. Zellzahlbestimmung

Ausgehend von frisch abgelösten Zellen, die in frischem Medium resuspendiert wurden, wird eine Zellzahlbestimmung vorgenommen. Dazu wird eine Zellkammer nach Neubauer verwendet. Das Deckplättchen wird so aufgelegt, dass Newtonsche Ringe zu sehen sind. 20µl der Zellsuspension werden durch die Zugabe von 180µl Trypanblau-Lösung 1:10 verdünnt und anschließend gut durchmischt. 15µl der Verdünnung werden mit einer Eppendorf-Pipette in eine der zwei Zählkammern gegeben, wobei sich der Flüssigkeitsfilm unter das Deckplättchen zieht. Unter dem Mikroskop lassen sich nun tote (blau gefärbt) von lebenden (hell leuchtend) Zellen unterscheiden. Ausgezählt werden nun die an den vier Ecken der Zählkammer liegenden Großquadrate, die jeweils aus 16 Kleinquadraten bestehen. Gezählt werden die hellen, lebenden Zellen, die deutlich innerhalb der Grenzen des Großquadrates liegen sowie alle Zellen, die an zwei der vier Außenseiten anliegen. Das Großquadrat hat eine Fläche von 1mm<sup>2</sup>. Die Schichtdicke beträgt bei richtiger Auflage des Deckplättchens 0,1mm. Um die Zellzahl in einem Volumen von 1mm<sup>3</sup> zu erhalten, muss der Mittelwert der 4 Großquadrate mit dem Faktor 10 multipliziert werden. Zusätzlich muss nun noch der Verdünnungsfaktor mit eingerechnet werden, wodurch sich dann die Zellzahl pro µl ergibt.

### 3.3.5. Bestimmung von Antibiotikumkonzentrationen für die Selektion stabil transfizierter Zellen

Um nach einer Transfektion Klone zu selektieren, die das transfektierte Plasmid mit Antibiotika-Resistenzgen stabil in ihr Genom integriert haben, müssen die transfektierten Zellen über mehrere Wochen mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelt werden. Die zur Selektion geeignete Konzentration des Antibiotikums muss vor Beginn der Transfektion für die jeweilige Zelllinie gesondert bestimmt werden. Dazu werden Zellen der zu prüfenden Zelllinie in mehrere T25 Kulturflaschen ausgesät und nach Erreichen von 60-80% Konfluenz mit unterschiedlichen Konzentrationen von Hygromycin B bzw. Blastocidin S in 5ml Kulturmedium behandelt. Während der Dauer der Selektion wird das Kulturmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach zweiwöchiger Selektion wird die Konzentration, bei der gerade alle Zellen abgetötet worden sind, bestimmt. Diese Konzentration wird für die Selektion der transfizierten Zellen eingesetzt.

Hygromycin B ist ein Aminoglycosid-Antibiotikum, das von *Streptomyces hygroscopicus* hergestellt wird. Es tötet Bakterien, Pilze und höhere eukaryontische Zellen durch die Blockade der Proteinbiosynthese, indem es bei der Translokation der RNA am Ribosom interferiert. Resistenz gegenüber Hygromycin B wird durch das *hph*-Genprodukt, einer Phosphotransferase, hervorgerufen. Als Arbeitskonzentration für MCF10A- und SK-OV-3-Zellen wurden 10µg/ml bzw. 50µg/ml bestimmt.

Blasticidin S ist ein Peptidynukleosid-Antibiotikum, das aus *Streptomyces griseochromogenes* isoliert wurde und spezifisch die Proteinbiosynthese in Prokaryonten und Eukaryonten unterbindet, indem die Peptidfreisetzung aus der ribosomalen Maschinerie inhibiert wird. Resistenz gegen Blasticidin wird durch die Desaminase *BSD* vermittelt. Als Arbeitskonzentration für NCI H460- und A549-Zellen wurden 15µg/ml bzw. 70µg/ml ermittelt.

### 3.3.6. Stabile Transfektion von Säugerzellen mittels Fugene 6<sup>®</sup>

Mit dem Transfektionsreagenz Fugene 6 können viele verschiedene Zelllinien in Anwesenheit von Serum äußerst effizient transfiziert werden. Das Reagenz ist dabei nicht zelltoxisch.

Die zu transfizierenden Zellen werden am Vortag in 6-Loch Platten so ausgesät, dass sie ca. 60 bis 70% konfluent sind (etwa  $5 \times 10^5$  Zellen pro Loch). Am Tage der Transfektion werden 94µl frisches Medium (ohne Zusätze) in einem sterilen Eppendorf Gefäß vorgelegt. Anschließend werden 6µl Fugene 6 zugegeben und das Gemisch 5min bei RT inkubiert. In einem weiteren Eppendorf Gefäß werden 2µg der zu transfizierenden DNA aliquotiert. Das Fugene 6-Medium Gemisch wird nun langsam zu der DNA getropft und nach einer gründlichen Durchmischung wird der Ansatz für 15min bei RT inkubiert. Danach wird der Transfektionsansatz langsam auf die Zellen geträufelt und die Zellen 24h bis 36h unter Kulturbedingungen inkubiert.

Anschließend werden die Zellen durch Trypsinieren abgelöst und in verschiedenen Verdünnungen (von 1:5 bis 1:50) in Selektionsmedium ausgesät. Die Selektion ist dann beendet, wenn in der Kontrolle (Transfektion ohne DNA) keine überlebenden Zellen mehr vorhanden sind.

### 3.3.7. Analyse der Proliferation durch Zellzahlbestimmung

CA-PKB/Akt-exprimierende und Kontroll-transfizierte Zellen werden in 6-Loch Platten mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Loch in Kulturmedium mit 10% Serum für 4-11 Tage kultiviert. Die Zellen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Coulter Counter (Beckmann-Coulter) gezählt. Dazu werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,5ml Trypsin Versene überschichtet. Nach einer Inkubation von ca. 3min werden die Zellen durch Anschlagen der Zellkulturplatten abgelöst und die Reaktion durch Zugabe von 1,5ml Medium abgestoppt. Anschließend werden die Zellen resuspendiert und zu 18ml Isoton in ein Messröhrchen gegeben. Unmittelbar vor der Messung wird die Zellsuspension durch Überkopfdrehen noch einmal durchmischt.

### 3.3.8. XTT-Test auf Dehydrogenase-Aktivität

Eine elegante Methode, die Lebendzellzahl eines Versuchsansatzes zu ermitteln, ist die Messung der Dehydrogenase-Aktivität. Bei der Metabolisierung von löslichen Tetrazoliumsalzen werden diese zu einem löslichen Formazan-Produkt reduziert. Da das Reaktionsprodukt im Gegensatz zum Edukt ein Absorptionsmaximum bei 490nm zeigt, lässt sich die Umwandlung am Photometer messen.

Am Versuchstag 1 werden die zu untersuchenden Zellen in Kulturmedium mit 10% Serum oder in Hungermedium mit 0,5% Serum aufgenommen und die Zellzahl auf  $5 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100µl der Zellsuspensionen werden mit der Multipette in 96-Loch-Platten (Falcon) eingesät und anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Testsubstanzen werden als Stammlösungen (10mg/ml) in DMSO angesetzt. Am Versuchstag 2 werden Verdünnungsreihen der zu testenden Substanzen im gleichem Medium wie am Vortag erstellt. Pro Loch werden 50µl der jeweiligen Verdünnungsstufe zugegeben, weswegen die Verdünnungsreihe 3-fach konzentriert gegenüber der gewünschten Endkonzentration angesetzt werden muss. Eine Dosiswirkungskurve wird für jede Substanz durch 4-fach Bestimmung jeder Konzentrationsstufe erstellt. Die Zellplatten werden nun für 72h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Am Versuchstag 5 werden XTT- und PMS-Lösung lichtgeschützt aufgetaut. PMS wird unmittelbar vor Gebrauch 1:50 in XTT-Lösung verdünnt. Bei der Auswertung der Mikrotiterplatten werden 75µl der XTT-PMS-Lösung pro Loch zugegeben und die Platte 3h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend werden die 96-Loch-Platten im Luminometer Victor<sup>®</sup> 1420 Multilabel Counter gemessen. Die Extinktion bei 490nm wird ermittelt, da dort das lösliche Formazan Produkt die höchste Absorption besitzt.

Die Absorptionen sollten in einem Bereich von 0,5 bis 2,0 liegen, damit die Genauigkeit der Messung gewährleistet ist. Der Absorptionsbereich kann durch die eingesetzte Zellzahl variiert werden.

<b>XTT-Lösung</b>	500mg	XTT-Pulver (Sigma Kat. #X-4626)
	500ml	RPMI 1640 ohne Phenolrot (Life Technologies Kat. #32404-014)
		XTT Festsubstanz wird in vorgewärmtem RPMI gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert
<b>PMS-Lösung</b>	0,383mg	Phenazine Methosulfat (Sigma Kat. #P-5812)
	1ml	PBS ohne Ca und Mg (Seromed Kat. # L1825)
		Die PMS Festsubstanz wird in der entsprechenden Menge PBS gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert

### 3.3.9. Analyse des Aktivierungsstatus von Akt/PKB in Tumorzellen

Akt wird durch den PI<sub>3</sub>-Kinase Signaltransduktionsweg zur Zellmembran rekrutiert und dort durch Phosphorylierung von Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> aktiviert. Dieser Aktivierungsschritt lässt sich im Immunoblot durch phosphospezifische Antikörper nachweisen.

Da die Zellen am Tag des Assays ca. 70-80% konfluent sein sollten, werden am Vortag  $4 \times 10^5$  der zu untersuchenden Zellen in Hungermedium mit 0,5% Serum in einem Volumen von 2ml in einer 6-Loch-Platte ausgesetzt. Nach der Aussaat sollen die Zellen mindestens für 16h in Hungermedium gehalten werden, um Akt/PKB in den nicht-aktivierten Zustand zu bringen. Pro Zelllinie werden drei verschiedene Zustände betrachtet, zum einen eine serumgehungerte, unstimulierte Kontrolle, zum anderen zwei Ansätze, die durch Zugabe von 200µl 10% FCS<sub>i</sub> bzw. 200µl 10% FCS<sub>i</sub> und 6µl eines Wachstumsfaktor-Cocktails stimuliert werden. Nach Zugabe der Stimulatoren werden die Zellen für 10min bei 37°C inkubiert, anschließend das Medium abgesaugt und die Zellen in 250µl Ripa-Puffer lysiert. Lyse und Ablösen der Zellfragmente werden im Mikroskop kontrolliert, die Lysate in Eppendorfgefäße überführt, 10 Sekunden mit Spitzenultraschall (50% Intensität, 50% Cycle) behandelt und im Immunoblot analysiert.



<b>Ripa-Puffer</b>	120mM	NaCl
	50mM	Tris pH 8.0
	1%	Triton X-100
	0.1%	SDS
	2mM	NaVO <sub>4</sub>
	50mM	NaF
	1mM	PMSF
<b>Wachstumsfaktor-Cocktail</b>	PDGF	finale Konzentration jeweils 10 ng/ml
	EGF	- Stocklösungen von 10 µg/ml herstellen
	IGF-1	pro Probe werden je 2 µl der drei Wachstumsfaktoren in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettiert

### 3.4. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1. Periplasma-Präparation von LB-Kulturen

Mit Hilfe dieses Zellaufschlussverfahrens nach Koshland und Botstein (1980) ist es möglich, vorwiegend Proteine des periplasmatischen Raumes zu isolieren. Der *E. coli*-Expressionsvektor pFLAG besitzt eine OmpA-leader-Sequenz, die die Proteine in den periplasmatischen Raum delegiert. Beim Durchtritt durch die periplasmatische Membran wird die OmpA-leader-Sequenz abgespalten.

Eine 500ml Kultur des zu untersuchenden Bakterienklons wird 16h mit IPTG (final 0,5mM) induziert und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wird zentrifugiert, das Zellpellet mit PBS gewaschen und in Saccharose-Lösung (20% w/v) aufgenommen, um die Zellen durch Wasserentzug zu schrumpfen. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen erneut pelletiert und anschließend durch die Zugabe von kaltem 10ml aq. dest einem osmotischen Schock unterworfen. Nach erneuter 15 minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen wiederum pelletiert, der Überstand abgenommen, das Volumen der Proteinlösung mit einer Centriplus™-Säule (Amicon) auf 500µl aufkonzentriert und anschließend analysiert.

#### 3.4.2. Nickel-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli*

Die Reinigung His-Schwanz-markierter rekombinanter Proteine über Nickel-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen eignet sich besonders für Proteine, die in *E. coli* als Expressionssystem hergestellt werden. Heterolog überexprimierte Proteine zeigen eine starke Tendenz zur Aggregatbildung in *E. coli* und fallen in Form sogenannter „Inclusionbodies“ aus. Für eine effiziente Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie sollte das Histidin-Cluster offen zugänglich und nicht durch andere Proteindomänen verdeckt sein. Die Denaturierung dient daher sowohl der Exposition des Histidin-Clusters als auch der Rückgewinnung der biologischen Aktivität. In der Regel erlaubt die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen eine höhere Effizienz und größere Reinheit als unter nativen Bedingungen.

<b>Puffer A:</b>	8M	Harnstoff
	250mM	NaCl
	50mM	Tris, pH ad 9.0

<b>Puffer B:</b>	8M	Harnstoff
	250mM	NaCl
	1M	Imidazol
	50mM	Tris pH 9.0
<b>Sonstiges:</b>	2%	NiSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O
	50mM	EDTA pH 8.0
		Chelating Sepharose (Pharmacia Biotech Cat. No 17-0575-01)

Eine 500ml Kultur des zu untersuchenden Bakterienklons wird 16h mit IPTG (final 0,5µM) induziert und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Das abzentrifugierte *E. coli* Zellpellet wird in mindestens 10x v/w Puffer A resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt mittels Spitzenultraschall (15x 30s, Intensität 70%), wobei die Suspension zwischen den einzelnen Zyklen mindestens 1min auf Eis abgekühlt wird. Nach dem Zellaufschluss wird die Suspension 30min bei Raumtemperatur leicht gerollert und anschließend im SS34 Rotor bei 12000rpm für 30min abzentrifugiert. Der Überstand wird durch einen Faltenfilter abgegossen und kann nun aufgereinigt werden.

Zur Vorbereitung der Chromatographiesäule wird diese mit ca. 3-4ml Chelating Sepharose beladen und mit 15ml aq. dest. gespült. Anschließend werden 15ml 2% NiSO<sub>4</sub>-Lösung auf die Säule gegeben, bis die Matrix einheitlich grün ist. Nach erneutem Spülen mit 15ml aq. dest. wird die Matrix mit 15ml Puffer A äquilibriert, wobei sich die Matrix leicht bläulich verfärbt. Nun kann die Säule mit dem bakteriellen Extrakt bei niedriger Flussrate beladen werden. Nach dem Beladen wird die Säule mit Puffer A gewaschen, bis die UV-Absorptions-Grundlinie wieder erreicht ist. Nun wird die Säule mit Puffer A / 2% Puffer B (entspricht 20mM Imidazol) gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu eluieren. Dies wird durch einen Peak bei der UV-Messung sichtbar. Die UV-Grundlinie wird nicht mehr erreicht, da Imidazol über eine Eigenadsorption bei 280nm verfügt. Die Elution erfolgt mit Puffer A / 20% Puffer B (entspricht 200mM Imidazol). Die Pumpe wird angehalten und die Säule für 30min mit Elutionspuffer inkubiert, sobald ein Anstieg der UV-Absorptionslinie zu beobachten ist. Nach dieser Zeit wird der Volumenfluss wieder angeschaltet und das Protein in mehreren Fraktionen aufgefangen. Die Proben können nun im Immunoblot analysiert und das Protein der Renaturierung unterworfen werden.

### 3.4.3. Renaturierung gereinigter rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Die Renaturierung rekombinanter Proteine, die unter denaturierenden Bedingungen über Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt wurden, ist Voraussetzung für die Wiedergewinnung der biologischen Aktivität. Zwei getrennte Parameter müssen bei der Rückfaltung berücksichtigt werden: Wiederherstellung von Disulfidbrücken und Rückfaltung der Proteindomänen. Dieses Protokoll bezieht sich ausschließlich auf die Zurückfaltung der Proteindomänen. Bei der Entfernung des denaturierenden Agens (Harnstoff) durch Dialyse tendieren rekombinante Proteine während eines kritischen Übergangszustandes zur Aggregatbildung. Das wird durch eine starke Trübung der Lösung im Dialyseschlauch sichtbar. Das angegebene Protokoll verhindert bei den meisten Proteinen die Aggregatbildung während des Übergangszustandes und erhöht somit dramatisch die Ausbeute an renaturiertem löslichen Protein.

<b>Renaturierungspuffer:</b>	PBS/1M L-Arginin Hydrochlorid: 210,7 g L-Arginin Hydrochlorid in 900 ml PBS lösen, pH Wert auf 7.4 einstellen, anschließend auf 1000 ml mit PBS auffüllen.
<b>Dialyseschlauch:</b>	vor Benutzung in 10 mM NaHCO <sub>3</sub> aufkochen

Das rekombinante Protein liegt in denaturierendem Puffer mit 8M Harnstoff vor und wird nun durch Zugabe von Renaturierungspuffer auf 400mM L-Arginin eingestellt und anschließend in einen Dialyseschlauch gefüllt. Der Renaturierungspuffer wird mit PBS auf eine Endkonzentration von 400mM L-Arginin verdünnt. Die Dialyse erfolgt in etwa 100-fachem Volumen der zu renaturierenden Proteinlösung (z.B. bei 10ml zu renaturierendem Protein wird 1l benötigt). Die Proteinlösung wird über Nacht auf einem Magnetrührer rührend bei 4-10°C im Renaturierungspuffer dialysiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich der Dialyseschlauch nicht in der Lösung mitdreht. Anschließend kann L-Arginin durch schrittweise Verdünnung gegen PBS herausdialysiert werden (200mM, 100 mM, 50 mM L-Arginin usw.). In manchen Fällen sind Mengen um 100mM L-Arginin nötig, um das Protein weiterhin in Lösung zu halten.

#### 3.4.4. Native Reinigung von Histidin-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Da die Reinigung unter nativen Bedingungen stattfindet, sollten sämtliche Schritte bei 4°C oder auf Eis durchgeführt werden. Generell ist die Bindung von Histidin-Clustern an Nickel-Ionen bei hohen NaCl-Konzentrationen und hohen pH-Werten am stärksten. Umgekehrt wird eine effektive Elution mit wenig NaCl und niedrigeren pH-Werten erreicht.

<b>Puffer A:</b>	300mM	NaCl
	50mM	Tris, pH ad 9.0
	0,5%	Lysozym (1mg/ml TGE-Puffer)
	1mM	PMSF
	100 µM	NaVO <sub>4</sub>
<b>Puffer B:</b>	300mM	NaCl
	1M	Imidazol
	50mM	Tris pH 9.0
	1mM	PMSF
	100 µM	NaVO <sub>4</sub>
<b>Sonstiges:</b>	2%	NiSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O
	50mM	EDTA pH 8.0
		Chelating Sepharose (Pharmacia Biotech Cat. No 17-0575-01)

Eine 500ml Kultur des zu untersuchenden Bakterienklons wird nach Inkubation über Nacht für 5h mit IPTG (final 0,1µM) induziert. Das abzentrifugierte *E. coli* Zellpellet wird in 200ml Puffer A resuspendiert und 30min bei 4°C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgt in 30ml Fraktionen mittels Spitzenultraschall (9x 20s, Intensität 60%), wobei die Suspension dabei die ganze Zeit auf Eis zu halten ist und zwischen den einzelnen Zyklen mindestens 5min auf Eis abgekühlt wird. Nach dem Zellaufschluss wird die Suspension 30min bei Raumtemperatur leicht gerollert und anschließend im SS34 Rotor bei 12000rpm für 30min abzentrifugiert. Der Überstand wird durch einen Faltenfilter abgossen und kann nun aufgereinigt werden.

Zur Vorbereitung der Chromatographiesäule wird diese mit ca. 3-4ml Chelating Sepharose beladen und mit 15ml aq. dest. gespült. Anschließend werden 15ml 2% NiSO<sub>4</sub>-Lösung auf die Säule gegeben, bis die Matrix einheitlich grün ist. Nach erneutem Spülen mit 15ml aq. dest. wird die Matrix mit 15ml Puffer A äquilibriert, wobei sich die Matrix leicht bläulich verfärbt. Nun kann die Säule mit dem bakteriellen Extrakt bei niedriger Flussrate beladen werden. Nach dem Beladen wird die Säule mit Puffer A gewaschen, bis die UV-Absorptions-Grundlinie wieder erreicht ist. Nun wird die Säule mit Puffer A / 1% Puffer B (entspricht 10mM Imidazol) gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu eluieren. Dies wird durch einen Peak bei der UV-Messung sichtbar. Die UV-Grundlinie wird nicht mehr erreicht, da Imidazol über eine Eigenabsorption bei 280nm verfügt. Die Elution erfolgt mit Puffer A /

20% Puffer B (entspricht 200mM Imidazol). Die Pumpe wird angehalten und die Säule für 30min mit Elutionspuffer inkubiert, sobald ein Anstieg der UV-Absorptionslinie zu beobachten ist. Nach dieser Zeit wird der Volumenfluss wieder angeschaltet und das Protein in mehreren Fraktionen aufgefangen. Dieser Vorgang sollte mehrere Male unterbrochen und um weitere Inkubationsschritte erweitert werden, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Proben können nun im Immunoblot und Aktivitätstest analysiert werden.

### 3.4.5. Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen (Bicinchoninic Acid)

Diese Protein-Bestimmungsmethode wird bei Zellyse mit Ripa-Puffer angewendet. Höhere Konzentrationen (>5%) von Detergentien (Triton-X100, NP-40, Tween 20) und Lösungsmittel (>1% DMSO, Ethanol, Methanol) sollten bei dieser Methode vermieden werden, da sie das Ergebnis verfälschen.

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen basiert darauf, dass Proteine in der Lage sind Kupfer(II)sulfatpentahydrat zu reduzieren. Das entstehende Kupfer(I)sulfat bildet einen Komplex mit Bicinchoninic Acid, dessen Absorptionsmaximum bei 562nm liegt. Die Absorption bei 562nm ist direkt proportional zu der vorhandenen Proteinkonzentration. Für die Reaktionslösung mischt man 50 Teile Bicinchoninic Acid mit einem Teil Kupfer(II)sulfatpentahydrat (4%ige Lösung). Für jede zu bestimmende Probe werden 500µl der Reaktionslösung mit 5µl der Proteinprobe gemischt. Als Leerprobe dienen 5µl des Puffers, in welchem die Proteine gelöst vorliegen. Die Ansätze werden für 20min bei 37°C inkubiert währenddessen ein Farbumschlag der proteinhaltigen Proben von Grün nach Violett zu beobachten ist. Je zweimal 200µl einer Probe werden in eine klare 96-Loch Platte überführt und in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 562nm photometrisch gemessen.

Berechnung des Proteingehaltes über den Absorptionswert:

$$\left( \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Leerwert}}}{0,0124} \right) \div \text{Volumen}_{\text{Probe}} = \text{Proteinkonzentration} \quad \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

0,0124: Konstante; Volumen<sub>Probe</sub>: 5µl

### 3.4.6. Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen (BioRad)

Diese Protein-Bestimmungsmethode wird bei Zellyse mit NP-40-Puffer angewendet und eignet sich nicht für Zellyse mit Ripa-Puffer, da die Methode bereits in sehr niedrigen Konzentrationen weder Triton X-100, Deoxycholat noch SDS toleriert.

Das Prinzip des Proteinnachweises des BioRad Protein-Assays beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250 an Proteine. In saurer Lösung wird durch diese Bindung das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm verschoben. Diese Absorptionsverschiebung nutzt man für die Protein-Quantifizierung. BSA (Rinder Serum Albumin) in bekannten Konzentrationen wird zur Erstellung einer Eichkurve verwendet (Protein-Standard). Bei jeder Proteinbestimmung muss die Eichkurve neu erstellt werden.

Konzentrierte Proteinlösungen sollten zu Beginn 1:100 – 1:1000 verdünnt werden, sodass das Mikro-Assay, das zur Bestimmung von 1-20µg Protein bei einer Konzentration von <25µg/ml geeignet ist, verwendet werden kann. Hierbei wird der Proteinstandard zur Erstellung einer Eichkurve in verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 und 25µg/ml verdünnt und die Eichkurve erstellt.

Entsprechend geht man für die Proben vor, deren Proteinkonzentration bestimmt werden soll. In eine Kunststoffküvette werden 800µl Probenpuffer mit der zu bestimmenden Proteinlösung

vorgelegt, anschließend 200µl Farbstoffreagenz-Konzentrat zugegeben und schließlich durch Überkopfschütteln gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 5min. bis 1h wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm am Photometer gegen einen Leerwert, bestehend aus entsprechend in Probenpuffer verdünntem Farbstoffreagenz-Konzentrat, bestimmt. Die Absorption bei 595nm wird graphisch gegen die Proteinkonzentration des Standards aufgetragen, eine Regressionsanalyse der Werte durchgeführt und die unbekannt Proteinkonzentrationen anhand der gemessenen Absorption<sub>595nm</sub> und der Eichkurve bestimmt.

### 3.4.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das denaturierende Polyacrylamidgel ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von ihrer Eigenladung. Die reduzierende Substanz β-Mercaptoethanol zerstört die Disulfidbrücken und damit die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Das anionische, zweifach-negativ geladene Detergens SDS bindet an hydrophobe Bereiche, linearisiert sie und versieht sie mit einer negativen Nettoladung. Die Proteine wandern nach Anlegen eines elektrischen Feldes umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts zur Anode.

Die Proteinproben werden zunächst auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt und mit SDS-Probenpuffer versetzt, der SDS und β-Mercaptoethanol enthält. Die Proteinproben werden für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend bis zum Auftrag auf das Gel auf Eis gehalten.

<b>SDS-Probenpuffer (4x)</b>	500mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	10%	SDS
	40%	Glycerin
	0,4%	Bromphenolblau
	4%	β-Mercaptoethanol

Zum Aufbau der Gelkammer wird je eine gründlich gesäuberte große Glasplatte mit Abstandhaltern und eine kleine Glasplatte aufeinander gelegt und im Gießstand durch eine Spange fixiert. Die Trenngellösung wird bis 1,5cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes eingegossen und sofort mit Butanol über H<sub>2</sub>O überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Butanol entfernt, die Sammelgellösung eingefüllt und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Ist das Sammelgel polymerisiert, wird der Kamm entfernt, die Probenaschen mit Wasser durchgespült und die Gelkassette in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Anschließend werden die Pufferkammern mit Laufpuffer gefüllt.

<b>Acrylamid Lösung (Roth)</b>	30% (w/v)	Acrylamid
	0,8% (w/v)	N, N-Methylenbisacrylamid
<b>Trenngelpuffer</b>	1,5M	Tris-HCl (pH 8,8)
<b>Sammelgelpuffer</b>	0,5M	Tris-HCl (pH 6,8)
<b>Trenngellösung für eines 10% Gels</b>	7,9ml	MilliQ H <sub>2</sub> O
	5,0ml	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
	6,7ml	Acrylamid
	0,2ml	10% SDS
	0,2ml	10% APS
	20µl	TEMED

<b>Trenngellösung für eines 13,5% Gels</b>	<b>20ml</b>	5,6ml	MilliQ H <sub>2</sub> O
		5,0ml	1,5M Tris-HCl (pH 8,8)
		9,0ml	Acrylamid
		0,2ml	10% SDS
		0,2ml	10% APS
		20µl	TEMED
<b>Sammelgellösung für eines 4% Gels</b>	<b>20ml</b>	11,9ml	MilliQ H <sub>2</sub> O
		5,0ml	0,5M Tris-HCl (pH 6,8)
		2,7ml	Acrylamid
		0,2ml	10% SDS
		0,2ml	10% APS
		20µl	TEMED
<b>SDS-Gelelektrophoresepuffer</b>		250mM	Glycin
		0,1%	SDS

Die Elektrophorese wird mit einer konstanten Spannung von 130V durchgeführt, wobei die Laufzeit ca. 60min beträgt.

Beim sich anschließenden Proteintransfer mittels Elektroblob werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran (z. B. PVDF) transferiert. Dies geschieht in einem elektrischen Feld, worin die SDS-beladenen Proteine zur Anode wandern. Zunächst werden PVDF Membran (Immobilon P<sup>®</sup>, MilliPore) und Blottingpapiere (GB004, Schleicher & Schüll) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Anschließend wird die PVDF Membran in Methanol aktiviert und zwei Papiere in Transferpuffer eingeweicht. Der Aufbau des Blots in der Blotkammer (Trans-blot<sup>®</sup> CD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) erfolgt nach folgendem Schema:

#### ***Kathode***

Blottingpapier mit Transferpuffer

Gel

PVDF-Membran

Blottingpapier mit Transferpuffer

#### ***Anode***

Ein ordnungsgemäßer Transfer der Proteine erfolgt nur, wenn die einzelnen Schichten luftblasenfrei aufgebracht werden. Bei einer Stromstärke von 2mA/cm<sup>2</sup> ist der Transfer nach einer Stunde abgeschlossen.

<b>Transferpuffer</b>	25mM	Tris-HCl (pH 10,4)
	192mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol

### 3.4.8. Immunoblot

Vor der Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper wird diese 30min mit 3% BSA in TTBS abgesättigt, um eine unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu minimieren. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1:500 bis 1:5000 Verdünnung in 3% BSA-TTBS bzw. in 3% BSA und 3% fettfreien Milchpulver-TTBS für Antikörper der Firma Santa Cruz) erfolgt über Nacht, die Inkubation mit dem zweiten, enzymkonjugierten (HRPO) Antikörper (1:5000 in 3% fettfreiem Milchpulver-TTBS) für eine Stunde. Zwischen den Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern und vor der Nachweisreaktion wird die Membran jeweils dreimal für mindestens 15min mit TTBS gewaschen, vor der Nachweisreaktion zusätzlich mit TBS.

Der Bindungsnachweis der Antikörper erfolgt mit dem Chemolumineszenzsystem Renaissance<sup>®</sup> (NEN) nach den Angaben des Herstellers.

<b>TTBS</b>	10mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150mM	NaCl
	0,1%	Triton X-100

Um eine Membran nach einem Immunoblot nochmals mit einem anderen Antikörper zu untersuchen, wird die Membran in 40ml Stripping Buffer gelegt und anschließend für 15min bei 60-70°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Membran wird danach dreimal für mindestens 15min mit TTBS gewaschen und wiederum für 30min mit 3% BSA in TTBS abgesättigt. Danach kann erneut der erste Antikörper zugegeben werden.

<b>Stripping Buffer</b>	62,5mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	2%	SDS
	870µl/100ml	β-Mercaptoethanol (immer frisch zugeben)

### 3.4.9. Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine können ab einer Konzentration von etwa 100ng pro Bande nach einer Inkubation in einer Coomassie-Brillantblau-Lösung als diskrete Bande sichtbar gemacht werden. Das gefärbte Gel wird in Fixierlösung unter mehrfachem Wechseln solange entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden eine Blaufärbung zeigen.

<b>Coomassie-Lösung</b>	40%	Methanol
	10%	Eisessig
	0,035%	Coomassie-Brillantblau R-250
<b>Fixierlösung</b>	40%	Methanol
	10%	Eisessig
	50%	MilliQ H <sub>2</sub> O

### 3.4.10. Untersuchung der β-Galactosidase-Aktivität

Der Galacto-Light Plus<sup>™</sup> Kit (Tropix / Perkin Elmer) ermöglicht den luminometrischen Nachweis von β-Galactosidase in Zelllysaten.

Dank eines mitgelieferten Hefe-Lysepuffers ist es möglich, Hefekulturen in der 96-Loch-Platte zu lysieren und anschließend direkt die β-Galactosidase-Aktivität zu bestimmen. Es ist somit auch möglich, verschiedene Hefestämme zu mischen, sie gemeinsam in einer Kavität zu lysieren und auf ihre β-Galactosidase-Komplementation zu untersuchen.

Hierzu werden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Hefestämme auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 eingestellt. Für Komplementationsversuche mit verschiedenen Hefestämmen wird eine Mischung von jeweils OD<sub>600</sub> = 0,1 der beiden Mutanten eingesetzt. Die Hefen werden pelletiert (2min / 14000rpm / 4°C) und die Pellets in 50µl aq. dest. aufgenommen. Pro Ansatz erfolgt die Zugabe von 50µl Reaktionsgemisch, das aus 39µl Hefe-Lysepuffer, 1µl Galacton-Substrat sowie 10µl Accelerator besteht. Die 96-Loch-Platte wird 30-60min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Luminometer gemessen.

Es ist ebenfalls möglich, bereits aufgeschlossene Proteinsuspensionen, sei es aus Hefe- oder Bakterienstämmen, auf ihre β-Galactosidase-Aktivität bzw. β-Galactosidase-Komplementation zu untersuchen. Die zu vermessenden Proteinlösungen werden auf ein Gesamtvolumen von 50µl gebracht, mit 50µl Diluent Buffer sowie 0,5µl Substrat versetzt und für 45min auf

dem Schüttler vorinkubiert. Nach Zugabe von 50µl des Accelerator II wird die Platte im Luminometer gemessen.

### 3.4.11. Co-Immunpräzipitation

Diese Methode dient zur Untersuchung der *in vitro*-Interaktion zweier Proteine. Die Proteine werden jeweils einzeln und in verschiedenen Mischungen in 300µl eines physiologischen Puffers aufgenommen, mit 2µg Antikörper, der spezifisch an eins der beiden Proteine bindet, versetzt und 45min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wird zu jedem Ansatz 40µl Protein A/G-Sepharose, die vorher im entsprechenden Puffer äquilibriert wurde, gegeben und 4h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Anschließend wird die Protein A/G-Sepharose pelletiert, zweimal mit 500µl TNET-Puffer und einmal mit 500µl TNE-Puffer (Rezepte siehe 3.4.13) gewaschen. Wenn die Proteine eine starke *in vitro*-Interaktion aufweisen, sind in der nun folgenden Immunoblot Analyse spezifische Banden beider Proteine zu detektieren.

### 3.4.12. Untersuchung der Kinaseaktivität von PKB/Akt

Der Akt Kinase Assay Kit (Cell Technology) stellt eine nicht-radioaktive Methode zur Bestimmung der PKB/Akt-Kinaseaktivität dar. Da die Zellen am Tag des Assays ca. 70-80% konfluent sein sollten, werden am Vortag  $1 \times 10^6$  der zu untersuchenden Zellen in Hungermedium mit 0,5% Serum in einem Volumen von 8ml in einer 10cm-Gewebe- kulturschale ausgesetzt. Nach der Aussaat sollen die Zellen mindestens für 16h in Hungermedium gehalten werden, um Akt/PKB in den nicht-aktivierten Zustand zu bringen. Pro Zelllinie werden zwei verschiedene Zustände betrachtet, zum einen eine serumgehungerte, unstimulierte Kontrolle, zum anderen ein Ansatz, der durch Zugabe von 200µl 10% FCS<sub>i</sub> und 6µl eines Wachstumsfaktor-Cocktails für 10min bei 37°C stimuliert wird. Zur Zellernte wird das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach durch die Zugabe von 300µl Zelllyse-Puffer (aus Kit) lysiert. Die Lysate werden in Eppendorfgefäße überführt, die Zelltrümmer pelletiert und der Überstand einer Immunpräzipitation unterworfen. Die Überstände sind von nun an immer auf Eis zu halten.

<b>Wachstumsfaktor- Cocktail</b>	PDGF	finale Konzentration jeweils 10 ng/ml
	EGF	- Stocklösungen von 10 µg/ml herstellen
	IGF-1	- pro Probe werden je 2 µl der drei Wachstumsfaktoren in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettiert

Zur Immunpräzipitation werden zwei unterschiedliche Antikörper verwendet. Um Wildtyp PKB/Akt aus dem Überstand zu präzipitieren, wird anti-Akt-Agarose, um das konstitutiv-aktive PKB/Akt-Konstrukt zu präzipitieren, anti-Flag-M2-Affinity-Gel verwendet. Diese beiden Matrix-gekoppelten Antikörper werden zunächst in Zelllyse-Puffer äquilibriert. Anschließend werden die Überstände nach Zugabe von jeweils 20µl der entsprechenden Antikörper für 4h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Nach dieser Zeit werden die Matrix-gekoppelten Antikörper pelletiert, zweimal mit jeweils 500µl Zelllyse-Puffer und einmal mit 500µl Kinase-Puffer (aus Kit) gewaschen. Die präzipitierten Proteine können nun auf ihre Kinaseaktivität untersucht werden.

Abbildung 3-5 zeigt eine schematische Darstellung des PKB/Akt Kinaseaktivitätstests. Wenn PKB/Akt an Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> phosphoryliert und somit aktiv ist, kann es das rekombinante PKB/Akt-Substrat GSK-3 an Ser<sup>9</sup> bzw. Ser<sup>21</sup> phosphorylieren. Mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen GSK-3 lässt sich diese Phosphorylierung im Immunoblot nachweisen. Zur Durchführung des Aktivitätstest wird das Pellet der präzipitierten Proteine in



40µl Kinase-Puffer aufgenommen. Nun werden 200µM ATP und 1µg rekombinantes GSK-3-Fusionsprotein zu jedem Ansatz gegeben und diese 30min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 20µl 3x SDS Probenpuffer und anschließendem Aufkochen auf 95°C wird die Reaktion abgebrochen. Die Proben können nun im Immunoblot analysiert werden.



Abb. 3-5 Schematische Darstellung des PKB/Akt Kinaseaktivitätstests.

### 3.4.13. Immunpräzipitation und Kinaseaktivitätstest der Focal Adhesion Kinase

Um zu klären, ob Focal Adhesion Kinase (FAK) an der PKB/Akt-vermittelten Verhinderung von Anoikis beteiligt ist, soll FAK aus MCF10A Wildtyp und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen immunpräzipitiert und anschließend auf seine Kinaseaktivität untersucht werden. MCF10A können in Bakterienchalen nicht adhären und unterlaufen somit Anoikis.

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen werden unter unterschiedlichen Kulturbedingungen wie folgt kultiviert:

1. 10cm Gewebekulturschale Hungermedium mit 0,5% Serum ohne weitere Zusätze
2. 10cm Gewebekulturschale Kulturmedium mit 10% Serum und allen Zusätzen
3. Bakterienchale Hungermedium mit 0,5% Serum ohne weitere Zusätze
4. Bakterienchale Kulturmedium mit 10% Serum und allen Zusätzen

Nach 16h Inkubation werden die Zellen mit 500µl Lysis-Puffer lysiert, die Zelltrümmer pelletiert (10min / 14000rpm / 4°C), der Überstand jeweils mit 2µg anti-FAK-Antikörper versetzt und dieser dann 45min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wird zu jedem Ansatz 40µl Protein A-Sepharose, die vorher in Lysis-Puffer äquilibriert wurde, gegeben und 4h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Anschließend wird die Protein A-Sepharose pelletiert, zweimal mit 500µl TNET-Puffer und einmal mit 500µl TNE-Puffer gewaschen. Die präzipitierten Proteine können nun auf ihre Kinaseaktivität untersucht werden.

<b>Lysis-Puffer</b>	100mM	NaCl
	50mM	Tris pH8
	100µM	NaVO <sub>4</sub>
	1%	NP40
	20mM	NaF
	1mM	PMSF
<b>TNET-Puffer</b>	140mM	NaCl
	50mM	Tris, pH7,5
	5mM	EDTA
	1%	NP40
<b>TNE-Puffer</b>	140mM	NaCl
	50mM	Tris, pH7,5
	5mM	EDTA

Mit allen Immunpräzipitaten werden Poly-Glu-Tyr Kinaseassays in einer Flash-Plate durchgeführt, an deren Oberfläche Proteine sehr gut anhaften können, wodurch die Messung des radioaktiv markierten Substrats nach mehreren Waschschrinen ermöglicht wird. Dazu werden die Pellets in 40 µl Assaypuffer resuspendiert, folgende Ansätze zusammenpipettiert und 60min bei 37°C inkubiert:

<b>Ansatz:</b>	40 µl	Immunpräzipitat in Assaypuffer
	19 µl	kaltes ATP
	20 µl	Poly-Glu-Tyr (final 1µM)
	1 µl	<sup>32</sup> P-ATP (10 µCi)
<b>Assaypuffer:</b>	100mM	Hepes pH 7.5
	2mM	DTT
	5µM	NaVO <sub>4</sub>
	15mM	MgCl <sub>2</sub>
<b>Sonstiges:</b>	kaltes ATP	100 µM Stocklösung in H <sub>2</sub> O
	Poly-Glu-Tyr	25mg/ml Stocklösung in H <sub>2</sub> O (Sigma P0275); 1:100 auf 250µg/ml verdünnen

Die Reaktion wird nach 1h durch die Zugabe von 100µl 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Platte wird nun dreimal mit MilliQ Aqua gewaschen und anschließend im Microbeta gemessen.

#### 3.4.14. Apoptose ELISA

Der Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche Molecular Biochemicals) detektiert Histon-assoziierte DNA-Fragmente (Homo- und Oligonukleosomen), die nach Induktion des Zelltodes durch Degradation der DNA entstehen. Zur Durchführung des ELISA wird das zu untersuchende Zelllysate in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Nun werden anti-Histon-Biotin- und anti-DNA-POD-Antikörper hinzugegeben und die Platte inkubiert. Der anti-Histon-Biotin-Antikörper bindet an Histone, die in Nukleosomen assoziiert sind, und koppelt dieses Aggregat über die Biotin-Streptavidin-Bindung an die Oberfläche der Mikrotiterplatte. Der anti-DNA-POD-Antikörper bindet an DNA, die in Nukleosomen assoziiert ist, und ist an eine Peroxidase gekoppelt, die ein Substrat (ABTS) umsetzen kann, das sich bei 405nm detektieren lässt.

Es werden jeweils  $2 \times 10^6$  der zu untersuchenden Zellen in 6-Loch-Platten in 2ml Hungermedium mit 0,5% Serum ausgesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nun werden die zur Induktion der Apoptose ausgesuchten Zytostatika zugegeben und diese Ansätze unterschiedlich lange inkubiert. Die Zellen werden nach der entsprechenden Zeit durch Zugabe von 200µl Lysepuffer (aus Kit) lysiert und für 30min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden pelletiert und jeweils 20µl (entspricht  $1 \times 10^3$  Zellen) in die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Für jeden Ansatz wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Zugabe von 80µl Immunoreagenz wird die Platte unter leichtem Schütteln 2h bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit Incubation Puffer gewaschen und anschließend jeweils 100µl ABTS-Lösung zugegeben. Nach 15min Reaktionszeit wird die Platte bei 405nm im Victor Multilabel Counter gemessen.

#### 3.4.15. Colorimetrischer Caspase 3 Aktivitätstest

Caspase 3 gehört zur Familie der Cystein Proteasen und die Pro-Caspase wird bei Aktivierung in ein 17 und 12kDa Fragment geschnitten. Der Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit (Calbiochem) ermöglicht den Nachweis von aktivierter Caspase 3 in Zelllysaten. Ein Caspase 3-spezifisches Substrat (DEVD-pNA) wird durch aktivierte Caspase 3 gespalten und p-Nitroanilin freigesetzt. p-Nitroanilin besitzt ein Absorptionsmaximum bei 405nm und kann somit im Victor Multilabel Counter quantifiziert werden.

$3 \times 10^6$  Zellen werden in einer 14cm Gewebekulturschale in Hungermedium mit 0,5% Serum ausgesät. Nach Inkubation für 16h bei 37°C werden die Zellen mit der entsprechenden

Konzentration an Zytostatika für eine jeweilige Dauer (24h bzw. 36h) behandelt. Die Zellen werden mit Trypsin abgelöst, pelletiert, mit PBS gewaschen und schließlich in 100µl Lysepuffer (aus Kit) für 5min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden pelletiert (10min / 10000g / 4°C) und der Überstand direkt im Aktivitätstest eingesetzt. Dazu wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

**Ansatz:**       80µl    Assay Puffer  
                   10µl    Zellextrakt  
                   10µl    Substrat (DEVD-pNA)

Als Negativkontrolle fungiert ein Ansatz ohne Zellextrakt, als Positivkontrolle werden 30U rekombinante Caspase 3 eingesetzt. Um zu überprüfen, ob es sich um eine spezifische Spaltung des Substrates durch aktivierte Caspase 3 handelt, wird jeweils ein Ansatz vor Zugabe des Substrates für 10min mit 20µl Caspase 3 Inhibitor behandelt. Durch Zugabe des Substrates wird die Reaktion gestartet und der Verlauf durch Messung alle 3min über einen Zeitraum von 75min im Victor Multilabel Counter bei 405nm verfolgt. Zur Auswertung muss zunächst der Konversionsfaktor bestimmt werden.

**Konversionsfaktor** [ $\mu\text{M}/\text{Abs}_{405}$ ] =  $50\mu\text{M} / \text{Abs}_{405}$  Negativkontrolle

Um nun die Caspase 3-Aktivität zu bestimmen, muss aus den oben gemessenen Daten der lineare Bereich bestimmt und daraus der Anstieg der Absorption bei 405nm pro min errechnet werden. Die Caspase 3-Aktivität ergibt sich dann nach folgender Formel:

**Aktivität** [ $\text{pmol}/\text{min}$ ] = Steigung  $\text{Abs}_{405}$  [ $\Delta_{\text{Abs}}/\text{min}$ ] x Konversionsfaktor x Volumen [ $\mu\text{l}$ ]

### 3.4.16. Colorimetrischer Caspase 8 Aktivitätstest

Caspase 8 gehört zur Familie der Cystein Proteasen und die Pro-Caspase wird bei Aktivierung in ein 18 und 11kDa Fragment geschnitten. Der Caspase-8 Cellular Activity Assay Kit (Calbiochem) ermöglicht den Nachweis von aktivierter Caspase 8 in Zelllysaten. Ein Caspase 8-spezifisches Substrat (Ac-IETD-pNA) wird durch aktivierte Caspase 8 gespalten und p-Nitroanilin freigesetzt. p-Nitroanilin besitzt ein Absorptionsmaximum bei 405nm und kann somit im Victor Multilabel Counter quantifiziert werden.

$3 \times 10^6$  Zellen werden in einer 14cm Gewebekulturschale in Hungermedium mit 0,5% Serum ausgesät. Nach Inkubation für 16h bei 37°C werden die Zellen mit der entsprechenden Konzentration an Zytostatika für eine jeweilige Dauer (24h bzw. 36h) behandelt. Die Zellen werden mit 400µl Lysepuffer (aus Caspase 3 Cellular Activity Assay Kit) überschichtet und für 5min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden pelletiert (10min / 10000g / 4°C) und der Überstand direkt im Aktivitätstest eingesetzt. Dazu wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

**Ansatz:**       50µl    Assay Puffer  
                   40µl    Zellextrakt  
                   10µl    Substrat (Ac-IETD-pNA)

Als Negativkontrolle fungiert ein Ansatz ohne Zellextrakt, als Positivkontrolle werden 30U rekombinante Caspase 8 eingesetzt. Durch Zugabe des Substrates wird die Reaktion gestartet, die Platte für 10min bei 37°C inkubiert und dann der Verlauf durch Messung alle 3min über einen Zeitraum von 75min im Victor Multilabel Counter bei 405nm verfolgt. Zur Auswertung muss zunächst der Konversionsfaktor bestimmt werden.

**Konversionsfaktor** [ $\mu\text{M}/\text{Abs}_{405}$ ] =  $50\mu\text{M} / \text{Abs}_{405}$  Negativkontrolle

Um nun die Caspase 8-Aktivität zu bestimmen, muss aus den oben gemessenen Daten der lineare Bereich bestimmt und daraus die Steigung der Absorption bei 405nm pro min errechnet werden. Die Caspase 8-Aktivität ergibt sich dann nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität [pmol/min]} = \text{Steigung Abs}_{405} [\Delta\text{Abs}/\text{min}] \times \text{Konversionsfaktor} \times \text{Volumen } [\mu\text{l}]$$

### 3.4.17. Colorimetrischer Caspase 9 Aktivitätstest

Caspase 9 gehört zur Familie der Cystein Proteasen und die Pro-Caspase wird bei Aktivierung in ein 35 und 10kDa Fragment geschnitten. Der Caspase-9 Colorimetric Assay (R&D Systems) ermöglicht den Nachweis von aktivierter Caspase 9 in Zellysaten. Ein Caspase 9-spezifisches Substrat (LEHD-pNA) wird durch aktivierte Caspase 9 gespalten und p-Nitroanilin freigesetzt. p-Nitroanilin besitzt ein Absorptionsmaximum bei 405nm und kann somit im Victor Multilabel Counter quantifiziert werden.

$3 \times 10^6$  Zellen werden in einer 14cm Gewebekulturschale in Hungermedium mit 0,5% Serum ausgesät. Nach Inkubation für 16h bei 37°C werden die Zellen mit der entsprechenden Konzentration an Zytostatika für eine jeweilige Dauer (24h bzw. 36h) behandelt. Die Zellen werden mit Trypsin abgelöst, pelletiert, mit PBS gewaschen und schließlich in 125µl Lysepuffer (aus Kit) für 10min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden pelletiert (10min / 10000g / 4°C) und der Überstand direkt im Aktivitätstest eingesetzt. Dazu wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

<b>Ansatz:</b>	50µl	Reaction Buffer
	50µl	Zellextrakt
	5µl	Substrat (LEHD-pNA)

Als Negativkontrolle fungiert ein Ansatz ohne Zellextrakt. Durch Zugabe des Substrates wird die Reaktion gestartet, die Platte für 1-2h bei 37°C inkubiert und dann im Victor Multilabel Counter bei 405nm vermessen.

### 3.4.18. Cytochrom C Fraktionierung und Quantifizierung mittels ELISA

Die Methode dient zur Trennung und Isolierung der mitochondrialen und der cytosolischen Fraktion von eukaryontischen Zellen mittels fraktionierter Zentrifugation, um die Verteilung von Cytochrom C zwischen diesen beiden Kompartimenten zu bestimmen [86].

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen werden für 4h bzw. 8h mit Zytostatika behandelt, um die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zu induzieren. Die Zellen werden nach dieser Zeit abtrypsiniert, pelletiert (5min / 2000rpm / 4°C) und mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 500µl Puffer A aufgenommen und die Zellen auf Eis in einem Teflon-Homogenisator homogenisiert (40x). Das Homogenat wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10min / 3000rpm / 4°C), um die Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wird erneut in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (30min / 13000rpm [12500g] / 4°C). Wiederum wird der Überstand abgenommen und mit 500µl Solubilisierpuffer versetzt. Dies stellt die cytosolische Fraktion dar. Das Pellet wird als mitochondriale Fraktion in 500µl Puffer B aufgenommen.

<b>Puffer A</b> (für 250ml):	20mM	Hepes-KOH, pH7,5
	10mM	KCl
	1,5mM	MgCl <sub>2</sub>
	1mM	Na EDTA
	1mM	Na EGTA
	1mM	DTT

250mM Sucrose  
frische Zugabe von PMSF, NaVO<sub>4</sub>

**Puffer B:** 1:1 Gemisch aus Puffer A und Solubilisierpuffer aus Caspase 9-Kit

Zur Durchführung des Cytochrom C ELISA (Oncogene) werden die cytosolische und mitochondriale Fraktion für 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert, um Cytochrom C zu solubilisieren. Nun werden 62,5µl der einzelnen Ansätze mit 187,5µl Calibrator Diluent RD5P (1x) versetzt und für 15min inkubiert. Währenddessen wird in jede Kavität der Mikrotiterplatte 100µl Calibrator Diluent RD5P (1x) vorgelegt, ehe nach Zugabe von 100µl der jeweiligen Probe die Ansätze für 2h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Platte wird anschließend viermal mit jeweils 400µl wash buffer gewaschen, wobei darauf zu achten ist, dass nach dem letzten Waschschrift die Platte gut getrocknet wird. Nun werden 200µl Cytochrome C conjugate zugegeben und die Ansätze erneut für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit jeweils 400µl wash buffer werden 200µl Substrate Solution zugegeben, die Platte im Dunkeln 30min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion nach dieser Zeit durch die Zugabe von 50µl Stop Solution beendet. Die Messung erfolgt innerhalb von 30min bei 450nm. Für jede Probe kann nun die prozentuale Verteilung von Cytochrom C in den beiden Kompartimenten berechnet werden.

### 3.4.19. FACS-Analyse

Mit dieser Methode lässt sich die Expression eines Proteins an der Zelloberfläche untersuchen. Jeweils  $1,3 \times 10^6$  Zellen in 10cm Gewebekulturschalen werden für eine bestimmte Zeit mit den zu testenden Zytostatika behandelt. Anschließend werden die zu markierenden Zellen mit EDTA/PBS abgelöst, pelletiert (5min / 2000rpm / 4°C), mit 5ml eiskaltem 70%-igem Ethanol fixiert und 24h bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen werden die fixierten Zellen pelletiert und in 3ml FACS-Lösung aufgenommen. Anschließend werden die Zellen erneut pelletiert, in 100µl FACS-Lösung aufgenommen und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. 5µl des FITC-markierten Antikörpers werden zu den einzelnen Ansätzen gegeben (Anti-Apo-1/Fas-FITC / Verdünnung 1:20) und diese für 30min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Danach werden die Zellen pelletiert und dreimal mit 750µl FACS-Lösung gewaschen. Nach jedem Waschschrift werden die Zellen für 5min bei 2000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wird das Zellpellet in 200µl FACS-Fixierlösung aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgt direkt in einem FACS-Scan Gerät der Firma Becton Dickinson mit einer Einstellung FL1 450 und SSC 340.

<b>FACS-Lösung</b>	1% (v/v)	FCS
	0,1% (v/v)	NaN <sub>3</sub> in PBS
<b>FACS-Fixierlösung</b>	1% (v/v)	Formaldehyd in PBS

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf-Interaktion

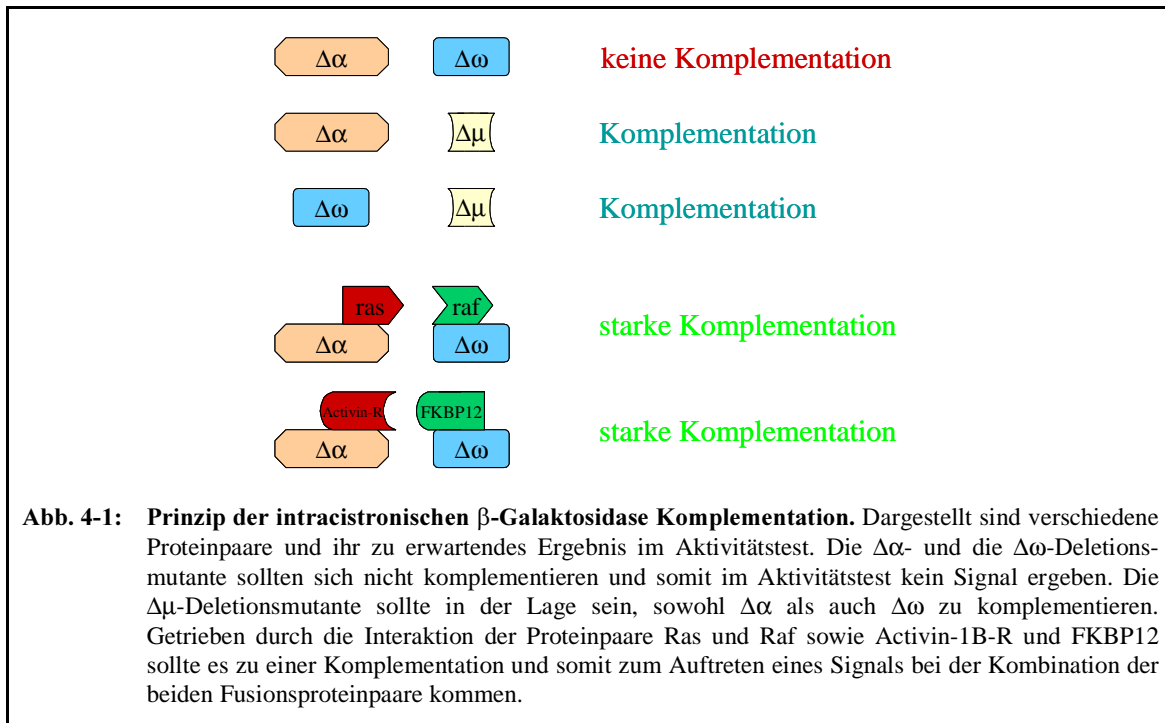
In einer Vielzahl maligner Transformationen spielt die Deregulation der Ras-Signalkaskade eine bedeutende Rolle, wobei der Protein-Protein-Interaktion zwischen Ras und Raf eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung dieses mitogenen Signalwegs zukommt [20, 37]. Erste Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet haben gezeigt, dass es sich bei der Inhibition der Ras-Raf-Interaktion um einen vielversprechenden Ansatz handelt, da mit Sulindac Sulfid eine Substanz gefunden werden konnte, die als Inhibitor dieser Protein-Protein-Interaktion fungiert und somit die Ras-induzierte Transformation von Tumorzellen potentiell verhindern kann [43, 161]. Die Entwicklung eines Testsystems zur Suche nach spezifischen Inhibitoren dieser Wechselwirkung stellt daher einen wichtigen Ansatzpunkt zur Findung weiterer Substanzen dar, die die mitogene Signalkaskade unterbrechen können. Der erste Teil dieser Promotionsarbeit befasste sich mit der Etablierung eines Testsystems zur Wirkstofffindung für Inhibitoren der Ras-Raf-Interaktion.

#### 4.1.1. Prinzip des Testsystems

Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase ist in seiner aktiven Form aus vier identischen Untereinheiten von jeweils 116kDa aufgebaut. In der Literatur wurden bakterielle Deletionsmutanten der  $\beta$ -Galactosidase beschrieben, die kein aktives Enzym bilden können. Durch die Zugabe des deletierten Abschnitts der  $\beta$ -Galactosidase zu diesen Deletionsmutanten lässt sich die Aktivität des Komplexes zum großen Teil rekonstituieren, ein Vorgang, der in der Literatur als  $\alpha$ -Komplementation beschrieben ist [164-166]. Diese komplementierte  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität entsteht durch die Dosis-abhängige Bildung eines stabilen Hetero-Oktamers, das eine ähnliche Domänenstruktur aufweist, wie das Wildtyp Homotetramer. Die N- und die C-terminale Region der  $\beta$ -Galactosidase, die bei der  $\alpha$ -Komplementation beteiligt sind, werden als  $\alpha$ - bzw.  $\omega$ -Region bezeichnet, das Zentralpeptid als  $\mu$ -Region.

Zur Entwicklung eines *in vitro* Testsystems, das Protein-Protein-Interaktionen detektierbar macht, wurden Deletionsmutanten wie in Abschnitt 3.1.10. beschrieben kloniert, die alleine nur sehr schwach miteinander interagieren können. Durch die Fusion der nicht-interagierenden Deletionsmutanten mit den beiden interagierenden Proteinen Ras/Raf<sub>(Interaktionsdomäne)</sub> sowie Activin-1B-Rezeptor/FKBP12 sollte eine Komplementation

ermöglicht und somit eine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität detektierbar gemacht werden (Abb. 4-1). Das Proteinpaar Activin-1B-R/FKBP12 wurde zur Validierung des Testsystems ausgewählt, da es sich zum einen um eine sehr starke, gut charakterisierte Protein-Protein-Interaktion handelt und zum anderen mit FK506 ein Inhibitor dieser Interaktion existiert, wodurch die Spezifität der  $\beta$ -Galactosidase-Komplementation überprüft werden kann.



Das Konstrukt  $\Delta\alpha$  entspricht der natürlich vorkommenden Mutation M15 und kann aufgrund des Vorhandenseins der zentralen  $\mu$  Domäne die Deletionsmutante  $\Delta\omega$  nur sehr schwach komplementieren. Die Deletionsmutante  $\Delta\mu$  sollte in der Lage sein, sowohl  $\Delta\alpha$  als auch  $\Delta\omega$  zu komplementieren und dient daher als Kontrolle. Die Struktur der Deletionsmutanten wurde analog zu einem *in vivo* Testsystem aus der Literatur übernommen [62].

#### 4.1.2 Expressionssystem *Pichia Pastoris*

Zunächst wurden die Gene der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase sowie der Deletionsmutanten im Expressionsvektor pPICZ-B stabil in den *Pichia Pastoris* Stamm SMD1163 transformiert und integriert. Nach Selektion rekombinanter Stämme mit Zeocin wurde die Expression der Proteine in Flüssigkultur induziert und die Enzymaktivität der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase, der einzelnen Deletionsmutanten sowie von Mischungen sich komplementierender und sich nicht-komplementierender Deletionsmutanten mittels eines hochsensitiven Substrats wie in Abschnitt 3.4.10. beschrieben (Galacton Light-Kit / TROPIX) detektiert. Für Wildtyp

$\beta$ -Galactosidase ließ sich nur eine sehr schwache Aktivität messen, während weder für die Deletionsmutanten alleine noch in Kombination mit ihren Komplementationspartnern eine Enzymaktivität beobachtet werden konnte. Mögliche Gründe für dieses Ergebnis lagen zum einen in einer sehr niedrigen Proteinexpression und zum anderen einem mangelhaften Aufschluss der Proben durch den mitgelieferten Hefelysepuffer.

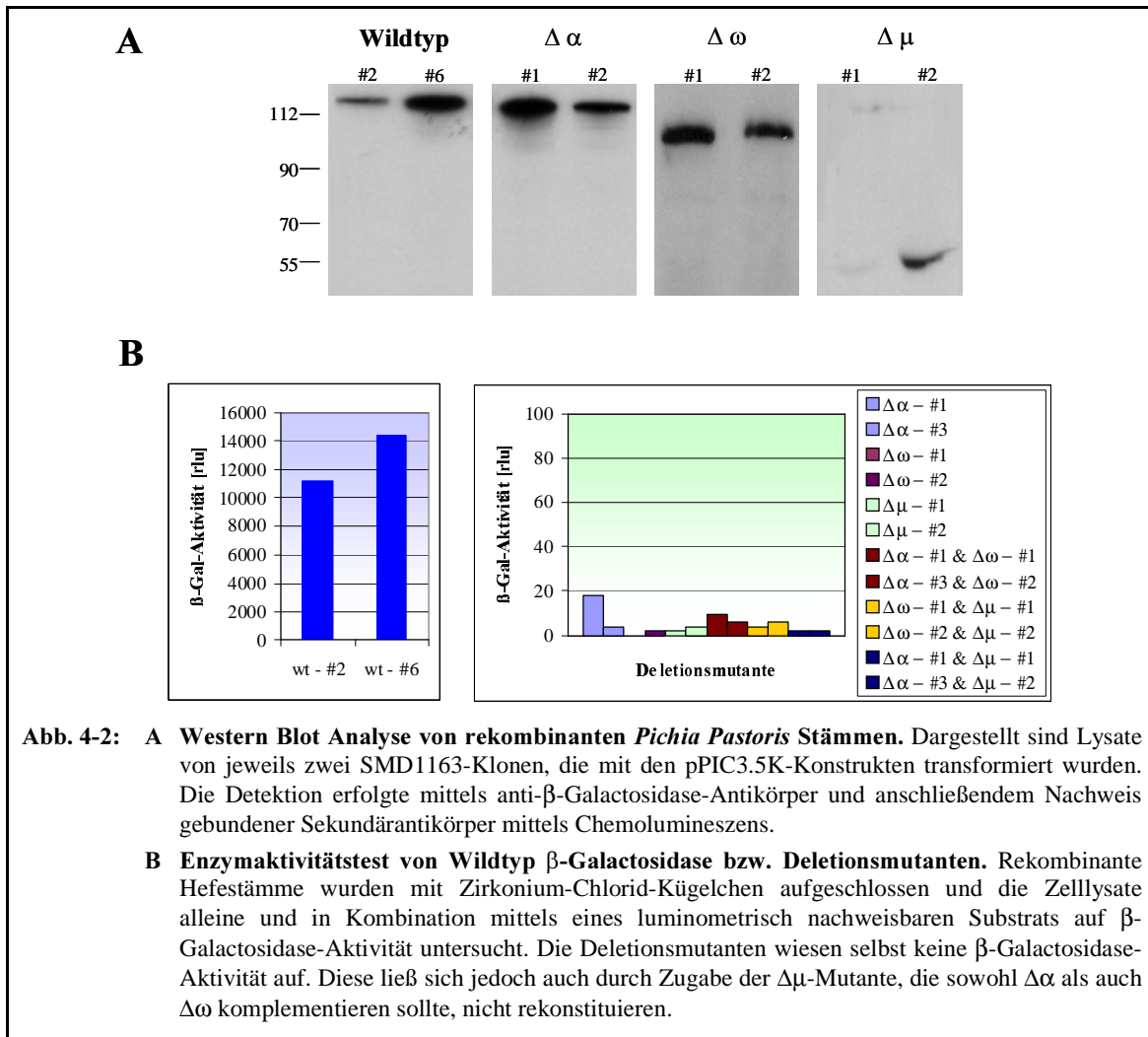
Um die Selektionsbedingungen rekombinanter Stämme zu optimieren wurde die Zeocin-Konzentration in verschiedenen Ansätzen erhöht, wobei sich zeigte, dass bei steigendem Selektionsdruck zwar die Gesamtzahl der selektierten Klone geringer war, diese Klone aber nicht zwangsläufig eine höhere Proteinexpression aufwiesen. Daher wurden die rekombinanten Hefekulturen in einem weiteren Ansatz zur Verbesserung der Aufschluss-effizienz mit Glas-Kügelchen und später auch mit Zirkonium-Chlorid-Kügelchen aufgeschlossen. Es konnte aber selbst durch die Veränderung des Aufschlussverfahrens keine Erhöhung des Signals im  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätstest erzielt werden. Auch eine Variation (sowohl Verlängerung als auch Verkürzung) der Induktionszeit der Hefestämme zeigte keine Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Das Hauptproblem dieses Ansatzes lag sehr wahrscheinlich an den zu niedrigen Expressionsraten der rekombinanten Hefestämme.

Um rekombinante Hefestämme mit einer höheren Expressionsrate zu erhalten, wurden die Gene der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase sowie der Deletionsmutanten in den Expressionsvektor pPIC3.5K umkloniert. Dieser Vektor besitzt zwei Vorteile gegenüber dem Vektor pPICZ-B: Zum einen kommt es bei der Transformation in *Pichia Pastoris* zu Mehrfach-Insertionen in das Genom, zum anderen erlaubt dieser Vektor eine Doppelselektion auf rekombinante Stämme. Zunächst wurde der *Pichia Pastoris* Stamm SMD1163 mit dem Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase-Konstrukt sowie den Deletionsmutanten-Konstrukten im Expressionsvektor pPIC3.5K mittels Elektroporation stabil transformiert. Die erste Selektion erfolgte auf Platten mit Histidin-freiem Medium, auf dem nur rekombinante Stämme wachsen können, da der pPIC3.5K-Vektor eine HIS4-Kassette enthält und somit die endogene Synthese von Histidin ermöglicht. In einem zweiten Selektionsschritt wurden die rekombinanten Stämme auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen G418 selektiert, da die Anzahl der Insertionen des Vektors ins Genom mit G418-Resistenz korreliert. Flüssigkulturen von Einzelklonen, die auf 1mg/ml G418 wuchsen, wurden induziert, mit Zirkonium Chlorid-Kügelchen aufgeschlossen und sowohl einer Western Blot Analyse als auch einer funktionalen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-2 dargestellt.

In der Western Blot Analyse konnte für jeweils zwei Klone die Expression der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase und der Deletionsmutanten gezeigt werden. Auch im funktionalen



Enzymaktivitätstest ließen sich höhere Werte für den Wildtyp detektieren als in den Experimenten mit pPICZ-B als Expressionsvektor, aber auch in diesem Ansatz konnte keine Komplementation der Deletionsmutanten *in vitro* beobachtet werden (Abb. 4-2B).

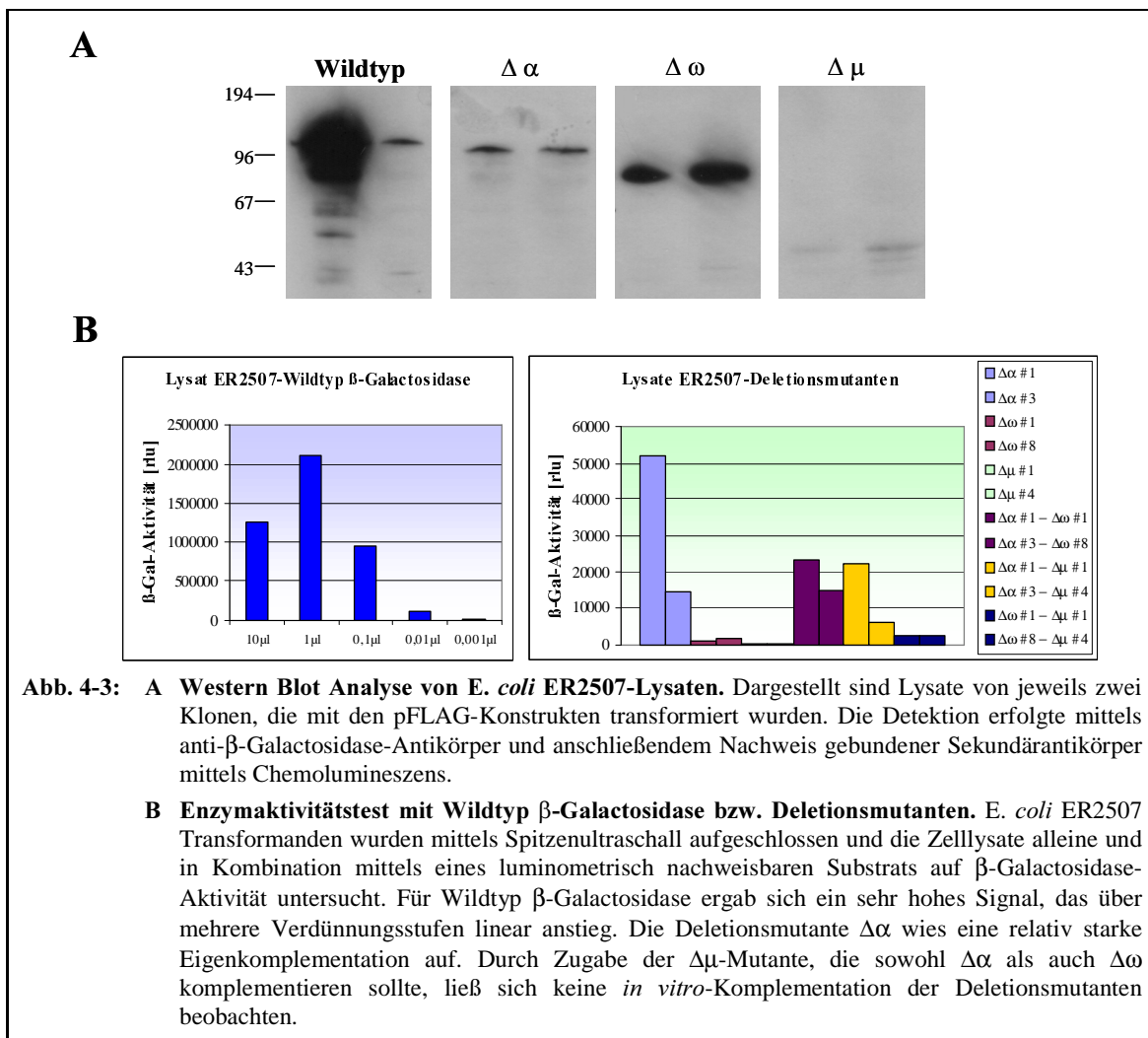


Durch die Verwendung des neuen Vektors und der daraus resultierenden Möglichkeit der Doppelsektion konnte das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis deutlich gesteigert werden. Vor allem das niedrige Signal der einzelnen Mutanten im Aktivitätstest würde es ermöglichen, dass eine *in vitro*-Komplementation der Deletionsmutanten detektierbar wird. Sowohl Wildtyp β-Galactosidase als auch die Deletionsmutanten ließen sich weiterhin ausschließlich in der Western Blot Analyse und nicht als prominente Bande im Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel nachweisen. Daher stellte möglicherweise die nach wie vor relativ geringe Expressionsrate der rekombinanten Stämme den Grund dar, dass keine *in vitro*-Komplementation zu beobachten war. Darüber hinaus wäre denkbar, dass endogene *Pichia Pastoris* Proteine, die sich im Zellaufschluss befinden, die *in vitro*-Komplementation der

Deletionsmutanten verhindern könnten. Da die Transformation der Konstrukte in *Pichia Pastoris* und die anschließende Selektion eine sehr zeitaufwendige Methode und darüber hinaus sehr anfällig gegenüber geringen Verunreinigungen ist, wurde beim weiteren Vorgehen mit einem bakteriellen Expressionssystem gearbeitet.

#### 4.1.3. Expressionssystem *E. coli* ER2507

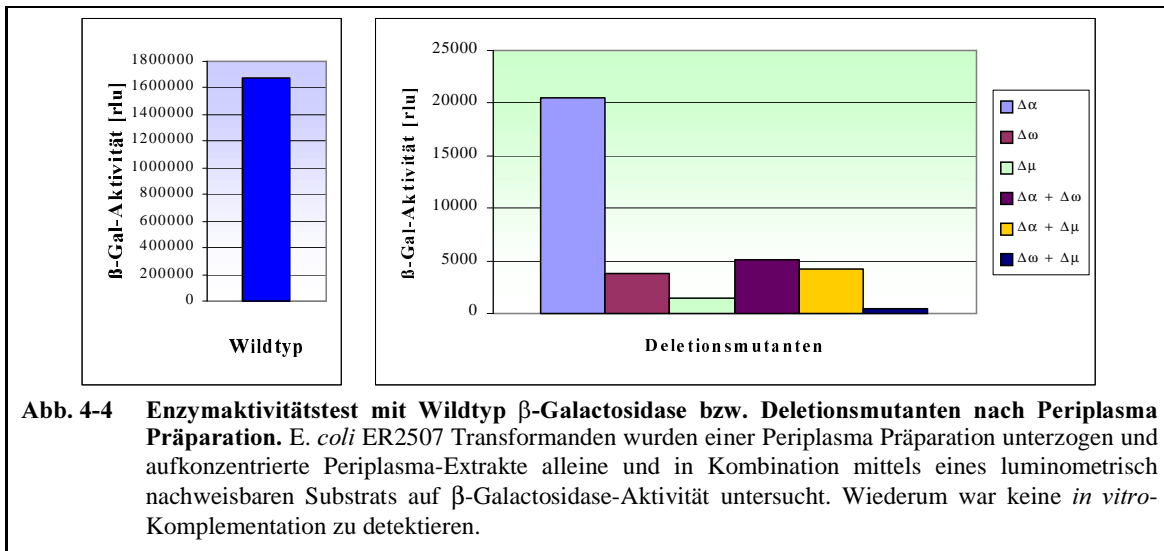
Die Konstrukte wurden wie in Abschnitt 3.1.10. beschrieben in den prokaryontischen Expressionsvektor pFLAG kloniert. Zur Expression der Deletionsmutanten wurde der *E. coli* Stamm ER2507, der keine endogene  $\beta$ -Galactosidase bzw.  $\beta$ -Galactosidase-Deletionsmutanten enthält, mit diesen Konstrukten transformiert, Flüssigkulturen von Einzelklonen mit IPTG (final 0,5mM) induziert und die Expression nach Lyse durch Spitzenultraschallbehandlung im Western Blot und im Enzymaktivitätstest analysiert. Die Expression der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase sowie der drei Deletionsmutanten konnte in der Western Blot Analyse nachgewiesen werden (Abb. 4-3A).



Im Enzymaktivitätstest mit Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase war im Vergleich zu den Ansätzen in *Pichia Pastoris* ein deutlich höherer Messwert zu detektieren, wobei das Messsignal für die Aktivität der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase über mehrere Verdünnungsstufen linear anstieg (Abb. 4-3B).

Bei den Komplementationsversuchen von jeweils 5 $\mu$ l Zellaufschluss der einzelnen Deletionsmutanten war allerdings wiederum keine *in vitro*-Komplementation von  $\Delta\alpha$  mit  $\Delta\omega$  bzw.  $\Delta\mu$  und von  $\Delta\omega$  mit  $\Delta\mu$  zu erkennen. Auch bei Veränderung der eingesetzten Proteinmenge in Versuchen mit jeweils 1 $\mu$ l bzw. 10 $\mu$ l Zellaufschluss konnte keine Komplementation beobachtet werden. Auffällig war jedoch, dass die Deletionsmutante  $\Delta\alpha$  alleine bereits ein relativ hohes Signal im funktionalen Aktivitätstest zeigte, während sowohl die Deletionsmutante  $\Delta\omega$  als auch die Deletionsmutante  $\Delta\mu$  eine sehr niedrige Hintergrundaktivität im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Deletionsmutante  $\Delta\alpha$  bedingt durch die Klonierung in den Vektor pFLAG N-terminal sowohl 8 Aminosäuren des FLAG-Epitops als auch weitere 12 Aminosäuren durch Translation der Multiple Cloning Site aufwies. Diese 20 Aminosäuren könnten somit einen Teil der deletierten  $\alpha$ -Domäne ersetzt haben. Bei den Fusionsproteinen der Deletionsmutante  $\Delta\alpha$  ist dies nicht relevant, da die zusätzlichen Aminosäuren in diesen Konstrukten nicht direkt vor der  $\beta$ -Galactosidase, sondern vor Ras bzw. Activin-1B-R sitzen und daher keinen Einfluss auf die Deletionsmutante mehr besitzen.

Um auszuschließen, dass endogene bakterielle Proteine, die nach dem Zellaufschluss im Lysat vorliegen, die *in vitro*-Komplementation der Deletionsmutanten verhindern, wurde eine Periplasma-Präparation der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase und der Deletionsmutanten  $\Delta\alpha$ ,  $\Delta\omega$  und  $\Delta\mu$  durchgeführt. Der pFLAG-Vektor besitzt neben der FLAG-kodierenden auch eine OmpA-kodierende Sequenz, wodurch exprimierte Proteine über ihre OmpA-leader-Sequenz in den periplasmatischen Raum dirigiert werden. Beim Eintritt der exprimierten Proteine in den periplasmatischen Raum kommt es zur Abspaltung der OmpA-leader-Sequenz. Die Konzentration endogener *E. coli*-Proteine ist im periplasmatischen Raum verhältnismäßig niedrig, so dass bei einer Periplasma-Präparation das exprimierte Protein im Vergleich zum Aufschluss der kompletten Zellen angereichert vorliegen sollte. Die Periplasma-Präparationen wurden mit Amicon Centriplus-100 (Wildtyp /  $\Delta\alpha$  /  $\Delta\omega$ ) bzw. mit Amicon Centriplus-50-Säulen ( $\Delta\mu$ ) aufkonzentriert und im Aktivitätstest analysiert. Auch bei diesem Ansatz konnte keine *in vitro*-Komplementation detektiert werden (Abb. 4-4).



Da weiterhin keine *in vitro*-Komplementation der Deletionsmutanten detektiert werden konnte, sollte im nächsten Schritt die prinzipielle Funktionalität der Deletionsmutanten überprüft werden. Dazu erfolgte eine Transformation aller pFLAG-Konstrukte in den Stamm *E. coli* XL1-Blue, der normalerweise für Blau-Weiß-Selektion verwendet wird und eine endogene M15- $\beta$ -Galactosidase-Mutante exprimiert, die der  $\Delta\alpha$ -Deletionsmutante entspricht. Der Stamm sollte in der Lage sein, alle  $\Delta\omega$ -Deletionsmutanten zu komplementieren. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pBlueskript verwendet, der durch Expression des  $\alpha$ -Peptids ebenfalls die M15- $\beta$ -Galactosidase-Mutante aus XL1-Blue komplementieren sollte. Als Negativkontrolle wurden alle Konstrukte in den Stamm *E. coli* ER2507 transformiert, in dem keine der Deletionsmutanten und Fusionsproteine komplementiert werden sollte. Die Transformationsansätze wurden zum direkten Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf LB-Amp-X-Gal-IPTG-Platten ausplattiert. Die Proteinexpression der Transformanden wurde dabei durch IPTG induziert. Nach erfolgreicher Komplementation innerhalb der Zellen konnte somit das chromogene Substrat X-Gal umgesetzt werden, so dass es zu einer blauen Färbung der Kolonien kommen konnte.

Aus Tabelle 4-1 geht hervor, dass die in *E. coli* XL1-Blue endogen exprimierte M15- $\beta$ -Galactosidase-Mutante wie erwartet in der Lage war, die  $\Delta\omega$ -Deletionsmutante und  $\Delta\omega$ -Fusionsproteine zu komplementieren. Auch die Positivkontrolle von pBlueskript in XL1-Blue wies die erwarteten blauen Klone auf. Dies zeigte, dass die  $\Delta\omega$ -Deletionsmutante und  $\Delta\omega$ -Fusionsproteine ordnungsgemäß und funktionell exprimiert wurden. Die Negativkontrolle (Transformation der Konstrukte in ER2507) wies wie erwartet nur beim Wildtyp blaue Klone auf. Die einzelnen Deletionsmutanten besaßen ohne Komplementationspartner keine

$\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Bei der Transformation und Expression der  $\Delta\alpha$ -Deletionsmutante in XL1-Blue entstanden wider Erwarten auch hellblaue Klone, was auf die bereits oben beschriebene klonierungsbedingte Verlängerung der Deletionsmutante zurückzuführen sein könnte. Dieses Phänomen war allerdings nur in XL1-Blue und nicht in ER2507 zu beobachten.

Ansatz	Konstrukt	XL1-Blue	ER2507
1	pFlag-wt	blau	blau
2	pFlag- $\Delta\alpha$	hell-blau	weiß
3	pFlag- $\Delta\omega$	blau	weiß
4	pFlag- $\Delta\mu$	blau	weiß
5	pFlag- $\Delta\alpha$ -Ras	weiß	weiß
6	pFlag- $\Delta\omega$ -Raf	blau	weiß
7	pFlag- $\Delta\alpha$ -Activin-R-1	weiß	weiß
8	pFlag- $\Delta\omega$ -FKBP12	blau	weiß
9	pBlueskript	blau	weiß

Tab. 4-1 Expression aller pFLAG-Konstrukte und Umsetzung des Substrats X-Gal in XL1-Blue (M15-Donor) bzw. ER2507.

Nachdem die funktionale Expression der  $\Delta\omega$ -Deletionsmutanten gezeigt werden konnte, wurden nun Doppeltransformationen verschiedener Proteinpärchen in ER2507 vorgenommen, wobei die DNA jeweils im Verhältnis 1:1 eingesetzt wurde. Die Doppeltransformationsansätze wurden wiederum auf LB-Amp-X-Gal-IPTG-Platten zum direkten Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität ausplattiert.

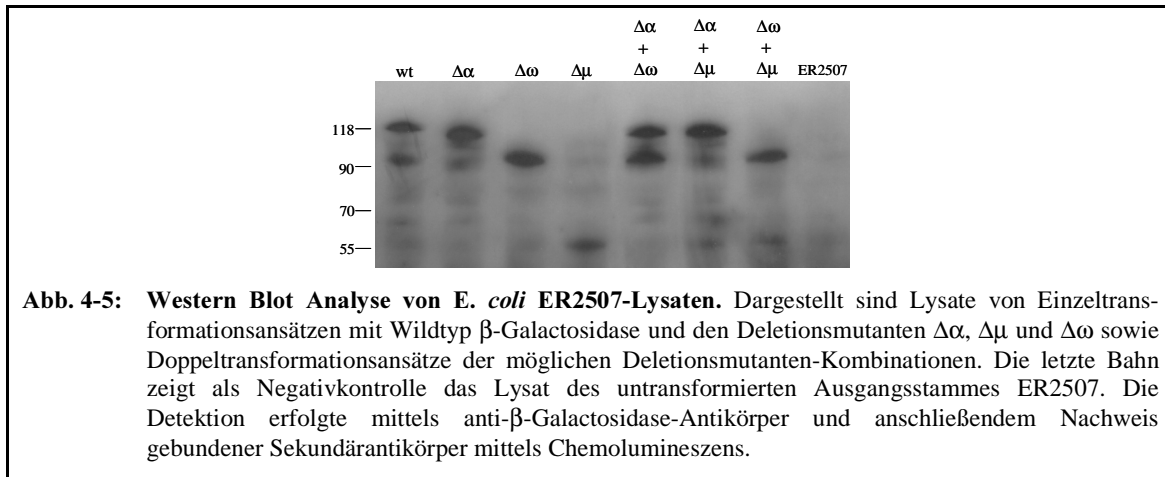
Ansatz	Konstrukt	24h Induktion
1	Wildtyp	blaue Klone
2	$\Delta\alpha + \Delta\omega$	einzelne blaue Klone
3	$\Delta\alpha + \Delta\mu$	einzelne blaue Klone
4	$\Delta\omega + \Delta\mu$	einzelne blaue Klone
5	$\Delta\alpha$ -Ras	weiße Klone
6	$\Delta\omega$ -Raf	weiße Klone
7	$\Delta\alpha$ -Activin-R-1	weiße Klone
8	$\Delta\omega$ -FKBP12	weiße Klone
9	$\Delta\alpha$ -Ras + $\Delta\omega$ -Raf	einzelne blaue Klone
10	$\Delta\alpha$ -Activin-R-1 + $\Delta\omega$ -FKBP12	blaue Klone

Tab. 4-2 Doppeltransformation durch Expression verschiedener Proteinpaare in *E. coli* ER2507 und Umsetzung des Substrats X-Gal.

Aus Tabelle 4-2 geht hervor, dass die Doppeltransformationsansätze sich komplementierender Deletionsmutanten und Fusionsproteine nach einer Induktionszeit von 24h blaue Einzelklone aufwiesen. Dies zeigt, dass bei erfolgter Doppeltransformation und induzierter Expression beider Mutanten eine *in vivo*-Komplementation erfolgte. Als Negativkontrollen fungierten hierbei die Transformationsansätze der einzelnen Fusionsproteine ( $\Delta\alpha$ -Ras,  $\Delta\omega$ -Raf,  $\Delta\alpha$ -

Activin-R-1 und  $\Delta\omega$ -FKBP12) in ER2507, bei denen ausschließlich weiße Einzelklone auftraten. Zur Umsetzung des Substrates X-Gal war also die funktionelle Expression beider sich komplementierender Deletionsmutanten notwendig.

Abbildung 4-5 zeigt eine Western Blot Analyse von induzierten Einzelklonen der Einzel- bzw. Doppeltransformationen von ER2507. In den Einzeltransformationsansätzen konnte das jeweilige Peptid in der erwarteten molekularen Größe detektiert werden. In den Doppeltransformationsansätzen sind jeweils zwei Banden des Peptidpärchens zu erkennen.

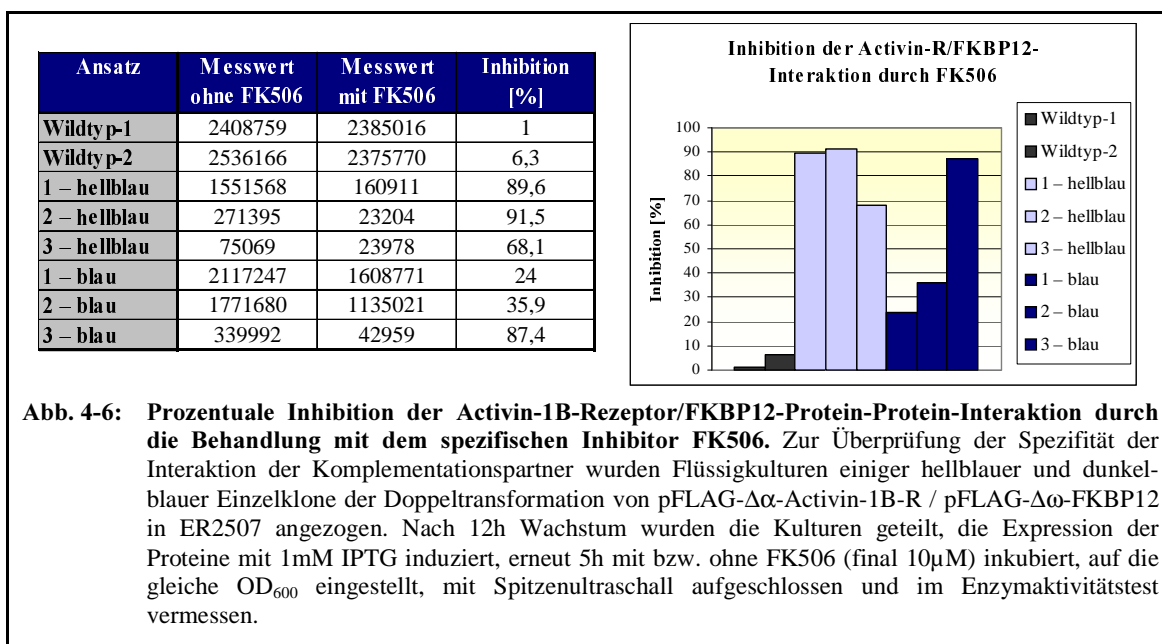


Etwa 10% aller erhaltenen Klone wiesen eine effiziente Doppeltransformation auf und färbten sich nach einer Induktionszeit von 48h dunkelblau. Weitere 20% der Transformanden zeigten eine hellblaue Farbe. Dies deutete darauf hin, dass auch in diesen Klonen eine Doppeltransformation erfolgt war, wobei vermutlich eine Mutante schwächer exprimiert wurde als die andere. Etwa 70% der Klone blieben weiß. Diese Klone exprimierten wahrscheinlich nur eine Mutante. Dieser Versuch belegt die funktionelle Expression beider Konstrukte bei Doppeltransformation und eine erfolgreiche *in vivo*-Komplementation in intakten Zellen zu einem funktionellen  $\beta$ -Galactosidase-Komplex. Dieses Ergebnis ließ sich bestätigen, indem Flüssigkulturen blauer Einzelklone angezogen, 16h mit IPTG (final 0,1mM) induziert, die Zellen mit Spitzenultraschall aufgeschlossen und die Lysate im funktionalen Enzymaktivitätstest vermessen wurden (Daten nicht gezeigt).

Um nun zu überprüfen, ob es sich um eine spezifische Interaktion der Komplementationspartner handelte, wurden Flüssigkulturen einiger hellblauer und dunkelblauer Einzelklone der Doppeltransformation von pFLAG- $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R / pFLAG- $\Delta\omega$ -FKBP12 in ER2507 angezogen. Nach 12h Wachstum wurden die Kulturen geteilt, mit IPTG (final 1mM) induziert, erneut 5h mit bzw. ohne FK506 (final 10 $\mu$ M) inkubiert, auf die gleiche OD<sub>600</sub> eingestellt, mit Spitzenultraschall aufgeschlossen und im Enzymaktivitätstest vermessen.

FK506 ist ein spezifischer Inhibitor der Activin-1B-Rezeptor/FKBP12-Protein-Protein-Interaktion. Um zu zeigen, dass FK506 keine negative Auswirkung auf Zellwachstum und Proteinexpression hat, wurden zwei Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase-exprimierende Stämme als Kontrolle analog behandelt. Abbildung 4-6 zeigt die prozentuale Inhibition der Activin-1B-Rezeptor/FKBP12-Protein-Protein-Interaktion durch die Behandlung mit FK506.

Die Inhibition der Activin-1B-R/FKBP12-Interaktion durch FK506 war in allen Flüssigkulturen zu erkennen, wobei sie in hellblauen Klonen nahezu vollständig war. Dies lag möglicherweise daran, dass sich in diesen Klonen durch die im Vergleich zu dunkelblauen Klonen niedrigere Expressionsrate von zumindest einem Fusionsprotein keine vergleichbar stabilen  $\beta$ -Galactosidase-Fusionsproteinkomplexe bilden konnten. Dass FK506 nicht unspezifisch Wachstum und Proteinexpression inhibierte, zeigten die Ergebnisse der beiden Kontrollkulturen mit Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase-exprimierenden Klonen, bei denen nahezu kein Unterschied zwischen der FK506-behandelten und der nicht-behandelten Kultur zu erkennen war. Somit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Activin-1B-R/FKBP12 *in vivo* durch FK506 spezifisch inhibierbar war.



Die Inhibition der Interaktion von Activin-1B-R/FKBP12 durch FK506 ließ sich allerdings ausschließlich beobachten, wenn FK506 bereits zu Beginn der Induktion der Flüssigkulturen zugegeben wurde. Wenn zunächst die Proteinexpression für 2h-4h induziert und FK506 erst nach dem Zellaufschluss für 1h-8h zugegeben wurde, hatten sich während der Induktionsphase in der Zelle sehr wahrscheinlich bereits stabile Fusionsprotein-Oligomere

gebildet, deren Interaktion durch die nachträgliche Zugabe des Inhibitors nicht mehr zu verhindern war. Daher sollten die Fusionsproteine im weiteren Vorgehen aufgereinigt werden. Dazu wurden alle Fusionsprotein-Konstrukte wie in Abschnitt 3.1.10. beschrieben mittels PCR mit einem Histidin(6x)-Schwanz versehen und Zelllysate aus Flüssigkulturen selektierter Einzelklone, die Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase,  $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R bzw.  $\Delta\omega$ -FKBP12 exprimierten, unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und renaturiert (siehe Abschnitt 3.4.2. und 3.4.3.). Da sich nach der Renaturierung beim Kontrollansatz mit Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase nur eine geringe Enzymaktivität beobachten ließ, wurde eine weitere Aufreinigung der drei selektierten Einzelklone unter nativen Bedingungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.4.).

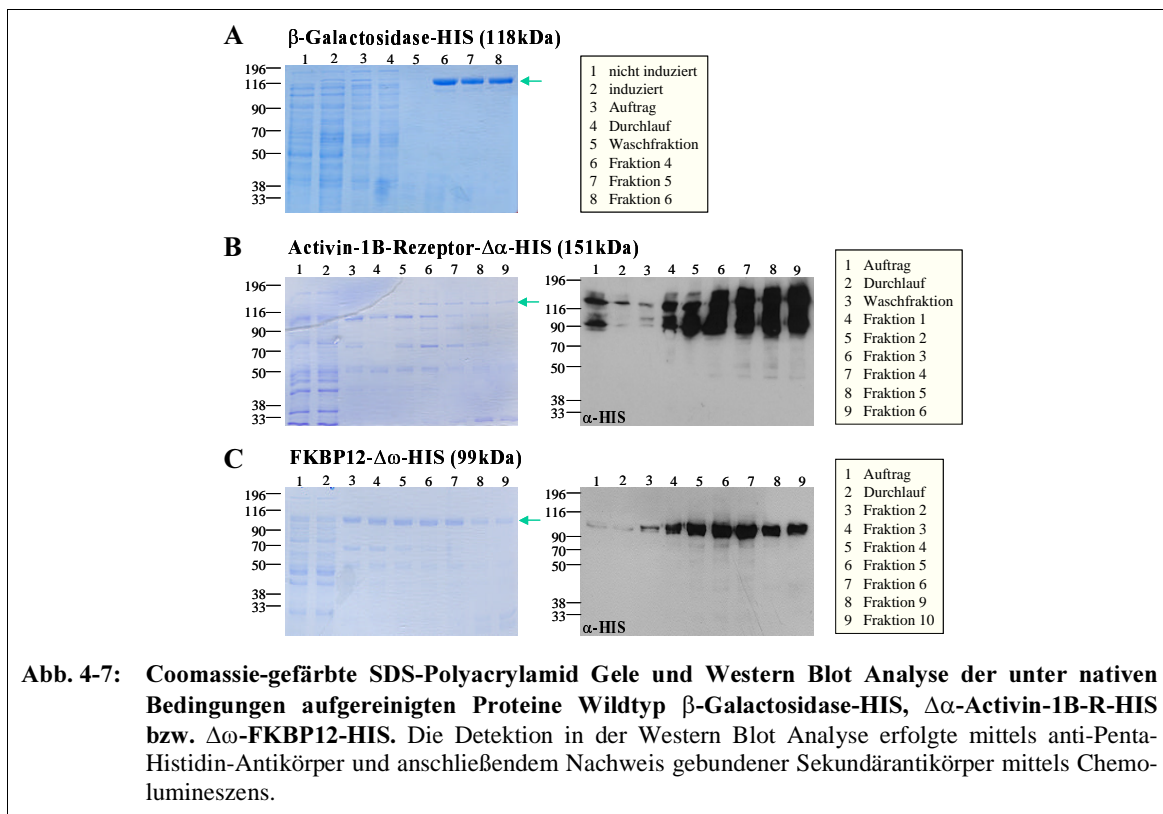


Abbildung 4-7 zeigt Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele der drei unter nativen Bedingungen aufgereinigten Proteine sowie die Western Blot Analysen der beiden Fusionsproteine. Auf den Coomassie gefärbten Gelen ließ sich eine deutliche Aufreinigung der drei Proteine erkennen. Der Ansatz mit Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase wies dabei fast keinerlei sichtbare Verunreinigungen innerhalb der Detektionsgrenze von 100ng/Bande auf. Die Ansätze der beiden aufgereinigten Fusionsproteine zeigten hingegen noch einige Verunreinigungen durch Fremdproteine. Dennoch waren beide Fusionsproteine in den Eluaten sehr stark angereichert, so dass die Effizienz der Aufreinigung zufriedenstellend war. In der Western Blot Analyse konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es sich bei den



aufgereinigten Proteinen um die Histidin-markierten Fusionsproteine mit der zu erwartenden molekularen Größe handelte.

Die Aktivität der aufgereinigten Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase konnte im Enzymaktivitätstest gezeigt werden (Abb. 4-8A). Die einzelnen aufgereinigten Fraktionen wiesen dabei eine etwas niedrigere  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf als das induzierte Zellysate vor der Aufreinigung, da die Proteinkonzentration der Fraktionen nach der Aufreinigung im Vergleich zum sehr konzentrierten Zellysate deutlich geringer war.

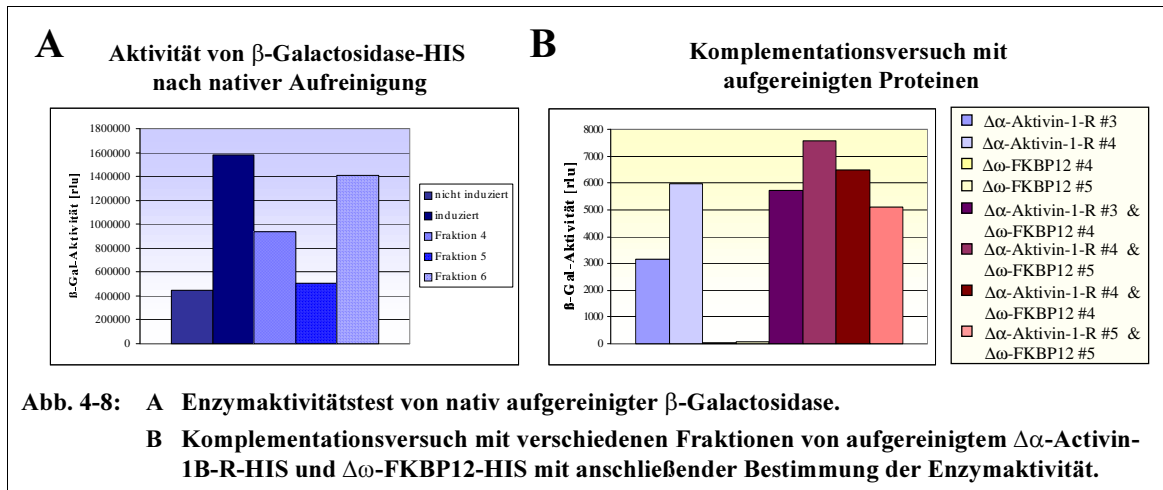
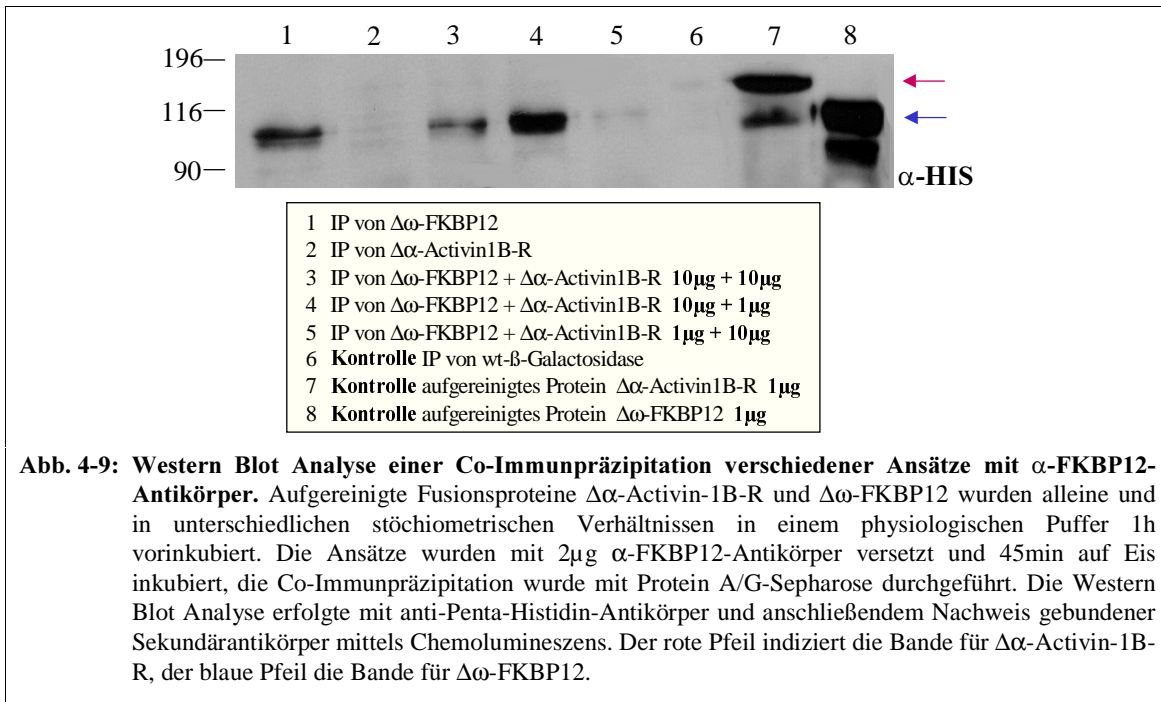


Abbildung 4-8B zeigt exemplarisch einen Komplementationsversuch mit den aufgereinigten Fusionsproteinen  $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R und  $\Delta\omega$ -FKBP12, wobei die Proteine hierbei in gleicher Menge (jeweils  $3\mu\text{g}$  Gesamtprotein) eingesetzt wurden. Eine Komplementation des Proteinpärchens ließ sich jedoch nicht detektieren. Weder Versuche mit Variation der Proteinmenge ( $1\mu\text{g}$ ,  $5\mu\text{g}$  bzw.  $10\mu\text{g}$  Gesamtprotein) und der Stöchiometrie (Verhältnis 1:10 bzw. 10:1) noch Versuche mit Vorinkubationszeit, innerhalb der sich die beiden Interaktionspartner zum aktiven Enzym komplementieren sollten, zeigten die erwartete Komplementation. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Proteine unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht oder nur sehr schwach miteinander interagieren und sich daher kein aktiver Enzymkomplex aus beiden Fusionsproteinen bildet. Zum anderen wäre es denkbar, dass zwar die beiden Interaktionspartner der Fusionsproteine miteinander wechselwirken, sich aber die Deletionsmutanten trotz stattfindender Interaktion nicht zu einem aktiven Enzymkomplex komplementieren können.

Zum Nachweis der Interaktion der beiden Fusionsproteine  $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R und  $\Delta\omega$ -FKBP12, wurde mit den aufgereinigten Fusionsproteinen und einem  $\alpha$ -FKBP12-Antikörper eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.11). Abbildung 4-9 zeigt die Western Blot Analyse dieser Co-Immunpräzipitation.



In den Ansätzen 1 und 2 wurde sowohl Δω-FKBP12 als auch Δα-Actinin-1B-R ohne Interaktionspartner immunopräzipitiert, um die Reaktivität des α-FKBP12-Antikörpers zu testen. Die Western Blot Analyse mit α-His-Antikörper zeigt lediglich in Ansatz 1 eine spezifische Bande, aber keinerlei Bande in Ansatz 2. Ebenso wurde in Ansatz 6 aufgereinigte Wildtyp β-Galactosidase-HIS immunopräzipitiert, wobei auch hier keine Bande zu erkennen ist. Der FKBP12-Antikörper zeigte also die gewünschte Spezifität. In den Ansätzen 3-5 wurden Co-Immünpräzipitationen der beiden aufgereinigten Fusionsproteine in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen durchgeführt. Während in allen drei Ansätzen Δω-FKBP12 präzipitiert werden konnte, ist lediglich in Ansatz 3 eine marginale Bande der richtigen molekularen Größe von Δω-FKBP12 zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion der beiden Fusionsproteine unter den gegebenen Bedingungen zu schwach ist, um eine erfolgreiche *in vitro*-Komplementation und damit Enzymaktivität beobachten zu können. Insgesamt konnte eine erfolgreiche Komplementation von Deletionsmutanten und Fusionsproteinen also nur in intakten *E. coli* Zellen, nicht aber *in vitro* gezeigt werden.

Die Weiterentwicklung des Testsystems wurde daraufhin nicht fortgeführt. Bei dem hier entwickelten Testsystem muss ein potentieller Inhibitor der zu untersuchenden Protein-Protein-Interaktion vor der Induktion der Proteinexpression mit IPTG zugegeben werden, da sich ansonsten in *E. coli* Proteinkomplexe ausbilden, die durch nachträgliche Zugabe eines potentiellen Inhibitors nicht mehr gelöst werden können. Dies stellt ein generelles Problem bei der Expression von Proteinen in *E. coli* dar. Die Etablierung eines reinen *in vitro*

Testsystems mit rekombinanten Proteinen schlug aufgrund der unter den getesteten Bedingungen zu schwachen Interaktion der Fusionspartner fehl.

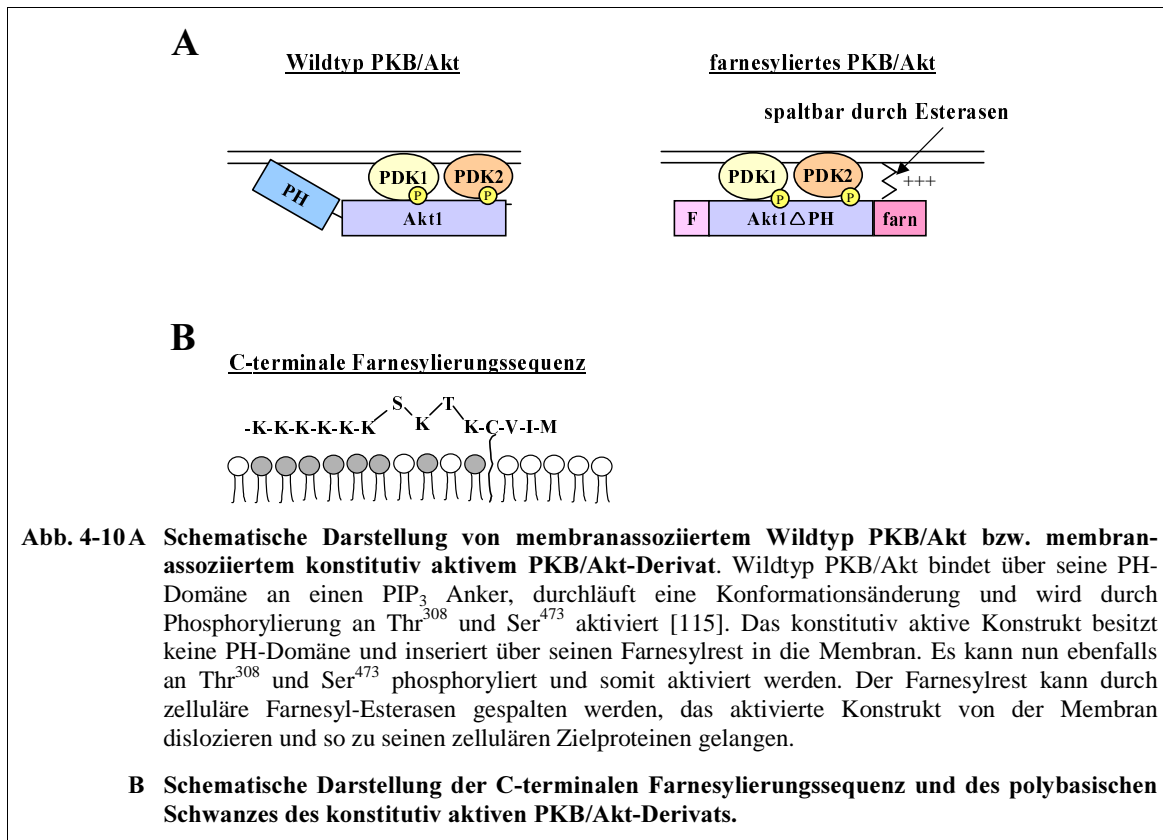
## 4.2. Validierung von PKB/Akt als Zielprotein in der Tumorthherapie

Der zweite Teil dieser Promotionsarbeit umfasste die Validierung der Kinase PKB/Akt im Hinblick auf die Entwicklung neuartiger anti-tumoraler Strategien. In der Literatur wird PKB/Akt als zentraler Mediator von zellulären Überlebenssignalen beschrieben, der in verschiedenen Tumoren konstitutiv aktiviert oder überexprimiert vorliegt [19, 110-112, 115]. Neben der Vermittlung anti-apoptotischer Signale scheint PKB/Akt auch beim Auftreten von Chemoresistenz beteiligt zu sein [18, 114]. Durch die Entwicklung geeigneter zellulärer Modelle sollte die Bedeutung von PKB/Akt insbesondere für das Auftreten von Chemoresistenz genauer beleuchtet sowie molekulare Mechanismen der Vermittlung von Chemoresistenz durch PKB/Akt aufgeklärt werden.

### 4.2.1. Etablierung genetisch veränderter Zelllinien, die konstitutiv aktives PKB/Akt exprimieren

Zelluläres PKB/Akt wird nach Bindung von Wachstumsfaktoren an ihren Rezeptor mittels Membranassoziation über seine PH-Domäne und Phosphorylierung an Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> durch PDK1 bzw. postulierte PDK2 aktiviert [115]. Zur Untersuchung der Rolle von PKB/Akt bei der Modulation des Eintretens von Anoikis und der Chemosensitivität von Tumorzellen gegenüber Standard-Chemotherapeutika sollte ein Derivat von PKB/Akt1 generiert werden, das unabhängig von der Stimulation durch Wachstumsfaktoren eine konstitutiv aktive Kinaseaktivität aufweist. Bisherige in der Literatur beschriebene Konstrukte mit konstitutiv aktivem PKB/Akt besitzen eine N-terminale Myrestylierungssequenz, die für die Membraninsertion und nachfolgende Aktivierung sorgt [162]. Da es sich bei Myrestylierung jedoch um einen irreversiblen, kovalenten Prozess handelt, ist nicht sichergestellt, dass solche Proteine auch von der Membran dislozieren und somit zu ihren zellulären Zielproteinen gelangen können. Um diese Limitation zu umgehen, wurde ein Derivat von PKB/Akt mit deletierter PH-Domäne (Aminosäuren 1-106) entwickelt, das neben einer N-terminalen FLAG-Markierung auch eine C-terminale Farnesylierungssequenz gefolgt von einem polybasischen Schwanz enthält (Abb. 4-10) [163]. Die Farnesylierung ist eine reversible Modifikation, da sie durch Farnesylesterasen gespalten werden kann. Der polybasische Schwanz wechselwirkt durch seine positive Ladung mit der negativ geladenen Kopfgruppe von membranären

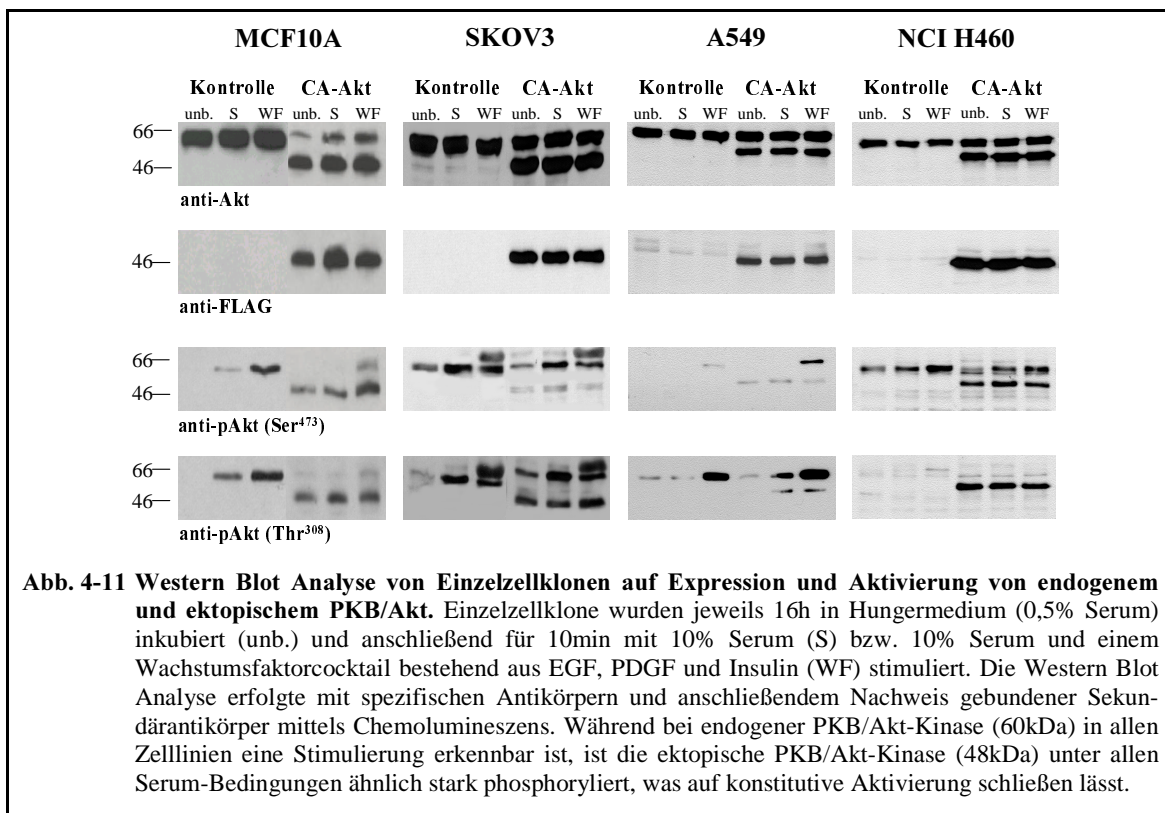
Phospholipiden und sorgt so für die energetischen Bedingungen, damit es zum Einschub des Farnesylrestes in die Membran kommen kann.



Die Vektoren zur Expression von konstitutiv aktiver PKB/Akt-Kinase wurden wie in Abschnitt 3.1.11. beschrieben kloniert, anschließend stabil in die immortalisierte Brustdrüsen-Epithelzelllinie MCF10A, die Ovaradenokarzinom-Zelllinie SK-OV-3 sowie die beiden Lungenkarzinom-Zelllinien A-549 und NCI H460 transfiziert und Einzelzellklone durch mehrwöchige Inkubation mit Antibiotika selektiert. Diese Einzelzellklone wurden auf Expression und Aktivierung von CA-Akt untersucht. Die Expression von endogener sowie ektopischer PKB/Akt-Kinase wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers als Bande bei etwa 60kDa bzw. 48kDa in der Western Blot Analyse detektiert (Abb. 4-11). Ektopisches CA-PKB/Akt ließ sich darüber hinaus mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers nachweisen.

PKB/Akt wird durch Phosphorylierung an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> aktiviert. Diese Aktivierung lässt sich mit phospho-spezifischen Antikörpern nachweisen. Zur Analyse des Aktivierungsstatus von endogener und ektopischer PKB/Akt-Kinase wurden daher jeweils kontroll-transfizierte bzw. CA-PKB/Akt-exprimierende Einzelzellklone wie in Abschnitt 3.3.9. beschrieben 16h in Hungermedium inkubiert und anschließend mit Serum bzw. Serum und einem Wachstumsfaktorcocktail bestehend aus EGF, PDGF und Insulin (WF) stimuliert.

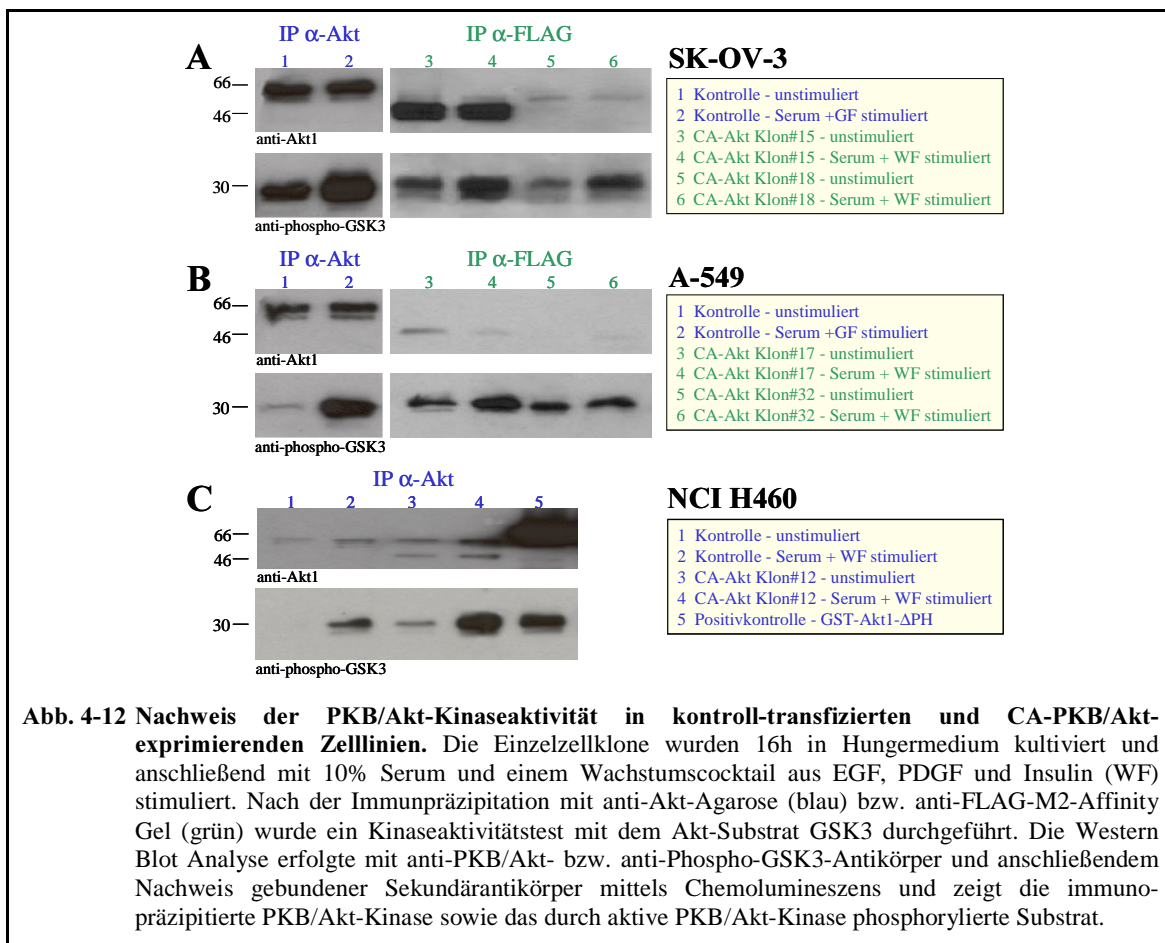
In allen kontroll-transfizierten Zelllinien ist unter Hungerbedingungen nur eine sehr geringe Phosphorylierung von PKB/Akt (60kDa) an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> zu erkennen, die jedoch durch Stimulation mit Serum und noch stärker durch Zugabe von Serum und Wachstumsfaktoren induzierbar ist. Die Aktivierung von endogenem PKB/Akt ist also abhängig von den Serumbedingungen, wobei nur unter Vollstimulation mit Serum und Wachstumsfaktoren eine vollständige Aktivierung erreicht wird. Ektopische PKB/Akt-Kinase weist in den CA-PKB/Akt-exprimierenden Einzelzellklonen aller vier Zelllinien unabhängig von den Serumbedingungen eine gleichmäßige Phosphorylierung an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> auf, was auf konstitutive Aktivierung schließen lässt.



Um nachzuweisen, dass die Phosphorylierung von PKB/Akt an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> mit Kinaseaktivität korreliert, wurden kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende Einzelzellklone zunächst im Serum-gehungerten und stimulierten Zustand mit anti-PKB/Akt-Agarose bzw. anti-FLAG-M2-Affinity-Gel immunopräzipitiert und anschließend auf Kinaseaktivität untersucht (siehe Abschnitt 3.4.12.). Abbildung 4-12 zeigt die Western Blot Analyse der Kinaseaktivität in SK-OV-3 (A), A-549 (B) sowie NCI H460 (C) Zelllinien. Aus kontroll-transfizierten SK-OV-3, A-549 und NCI H460 Zelllinien wurden im unstimulierten sowie stimulierten Zustand mit anti-PKB/Akt-Agarose vergleichbare Mengen endogener PKB/Akt-Kinase immunopräzipitiert. Das spezifische PKB/Akt-Substrat GSK-3 ist aber im

stimulierten Zustand deutlich stärker phosphoryliert als im unstimulierten Zustand. Die endogene Kinaseaktivität lässt sich also durch Induktion der Phosphorylierung von PKB/Akt an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> deutlich steigern. Während A-549 und NCI H460 Zelllinien nur eine sehr geringe basale PKB/Akt-Kinaseaktivität aufweisen, zeigen SK-OV-3 Zellen bereits im unstimulierten Zustand eine sehr starke Kinaseaktivität, die sich durch Stimulation mit Serum und Wachstumsfaktoren noch weiter erhöhen lässt.

Bei der Immunpräzipitation von ektopischem CA-PKB/Akt aus SK-OV-3 Einzelzellklonen mit anti-FLAG-M2-Affinity-Gel wurden im unstimulierten sowie stimulierten Zustand ebenfalls jeweils vergleichbare Mengen präzipitiert, wobei die Proteinmenge bei Klon #18 insgesamt nur sehr gering war. In beiden Klonen konnte jedoch Kinaseaktivität der ektopischen CA-PKB/Akt-Kinase nachgewiesen werden, die allerdings im stimulierten Ansatz ebenfalls höher war als im unstimulierten Ansatz. Bereits in Abbildung 4-11 konnte für ektopische PKB/Akt-Kinase eine etwas stärkere Phosphorylierung an Rest Thr<sup>308</sup> nach Stimulation im Vergleich zum gehungerten Zustand beobachtet werden, was wiederum die Korrelation zwischen Phosphorylierungsstatus und Kinaseaktivität zeigt.



Bei der Immunpräzipitation von ektoischem CA-PKB/Akt aus A-549 Einzelzellklonen mit anti-FLAG-M2-Affinity-Gel wurden wiederum vergleichbare Mengen präzipitiert, wobei die Kinaseaktivität im stimulierten und unstimulierten Zustand vergleichbar war.

Aus einem CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Einzelzellklon wurde unter Verwendung von anti-PKB/Akt-Agarose sowohl endogene als auch ektoische PKB/Akt-Kinase immunpräzipitiert. Endogene PKB/Akt-Kinase zeigt unter Hungerbedingungen keinerlei Phosphorylierung von GSK-3 (Abb. 4-12 C – Spur 1). Im Einzelzellklon #12 lässt sich unter Hungerbedingungen Kinaseaktivität beobachten, die durch ebenfalls präzipitierte ektoische PKB/Akt hervorgerufen wird. Die Zunahme der Kinaseaktivität in Spur 4 ist auf die Aktivierung der endogenen PKB/Akt-Kinase nach Stimulation zurückzuführen.

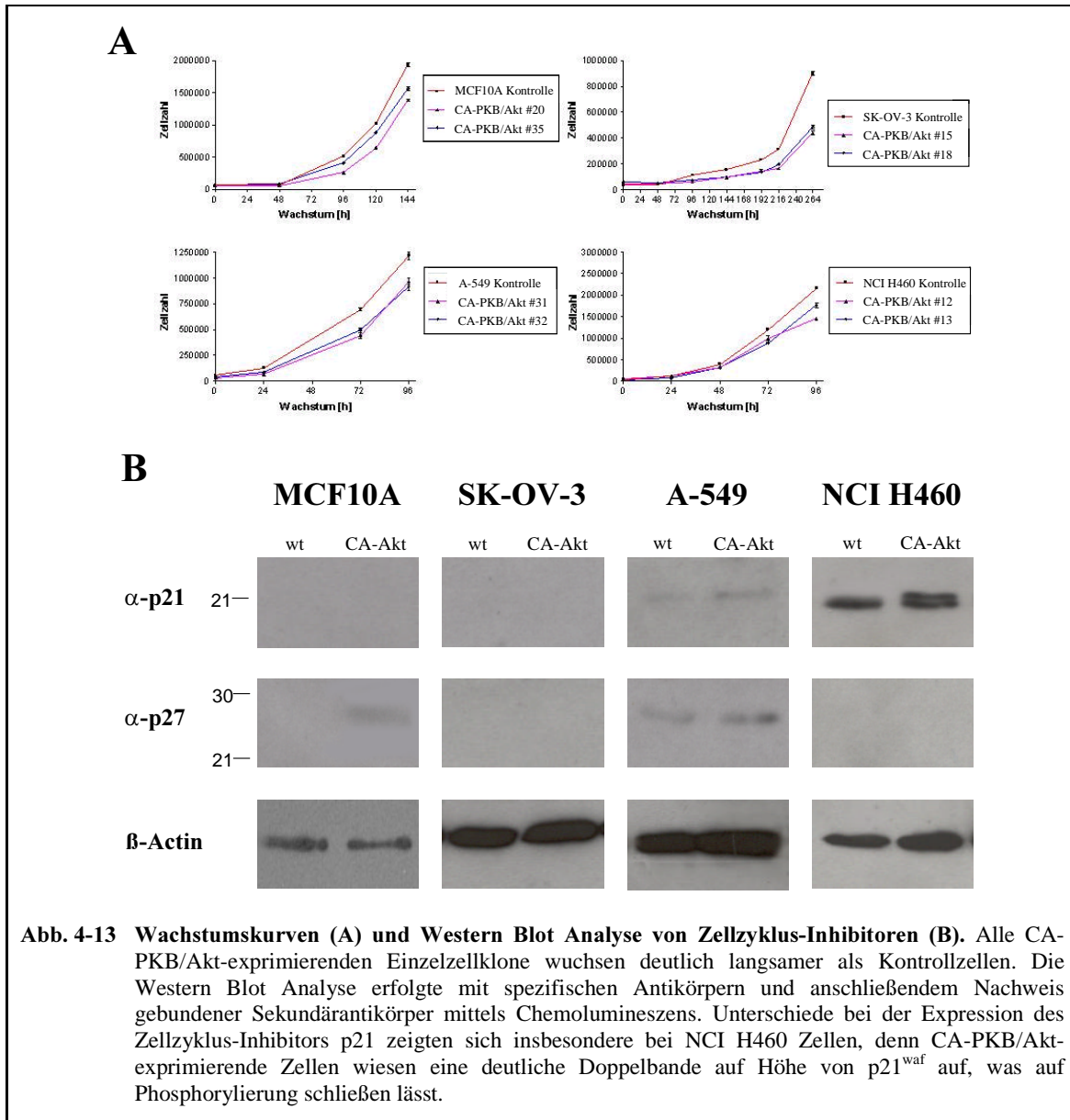
Es konnte also in CA-PKB/Akt-exprimierenden Einzelzellklonen aller Zelllinien Kinaseaktivität der ektoischen PKB/Akt-Kinase nachgewiesen werden. Die Zelllinien A-549 und NCI H460 wiesen eine relativ geringe, durch Wachstumsfaktoren gut stimulierbare endogene PKB/Akt-Kinaseaktivität auf, während in SK-OV-3 Zellen bereits eine sehr hohe endogene PKB/Akt-Kinaseaktivität detektiert werden konnte, die sich durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren weiter steigern ließ.

Bei der Bestimmung der Proliferationsrate (siehe Abschnitt 3.3.7.) von Einzelzellklonen fiel auf, dass CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen deutlich langsamer wuchsen als die Kontrollzelllinie (Abb. 4-13A). Daher wurde eine Western Blot Analyse der Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27 vorgenommen (Abb. 4-13B). CA-PKB/Akt-exprimierende MCF10A Zellen exprimierten deutlich größere Mengen p27 als kontroll-transfizierte MCF10A Zellen, während die Expression von p21 in beiden Zelllinien unterhalb der Detektionsgrenze lag. In den SK-OV-3 Zelllinien konnte weder p21 noch p27 detektiert werden, während sich in den A-549 Zelllinien für beide Zellzyklus-Inhibitoren eine leicht erhöhte Expression in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen zeigte. Der deutlichste Unterschied war jedoch in der p21 Expression von CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen zu beobachten. Das Auftreten einer Doppelbande lässt auf eine Phosphorylierung von p21 in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen schließen.

Die Phosphorylierung von p21<sup>waf1</sup> an Thr<sup>145</sup> durch PKB/Akt in HER2-überexprimierenden Zellen wurde kürzlich von Zhou et al. gezeigt [109, 179]. Nach seiner Phosphorylierung ist p21<sup>waf1</sup> nicht mehr in der Lage, in den Zellkern zu translozieren. Phosphoryliertes p21<sup>waf1</sup> bindet an ASK1 und verhindert so das Auftreten von ASK1-abhängiger Apoptose. Als Zellzyklusinhibitor verliert Phospho-p21<sup>waf1</sup> allerdings seine Funktion [179]. Darüber hinaus scheint p27<sup>kip1</sup> ebenso durch PKB/Akt phosphoryliert und somit zytosolisch reteniert zu



werden, wodurch Phospho-p27<sup>kip1</sup> auch keinen Zellzyklusarrest mehr vermitteln kann [109]. Daher scheint es möglich, dass neben p21<sup>waf</sup> und p27<sup>kip1</sup> weitere Faktoren für ein verlangsamtes Wachstum der CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen verantwortlich sind.

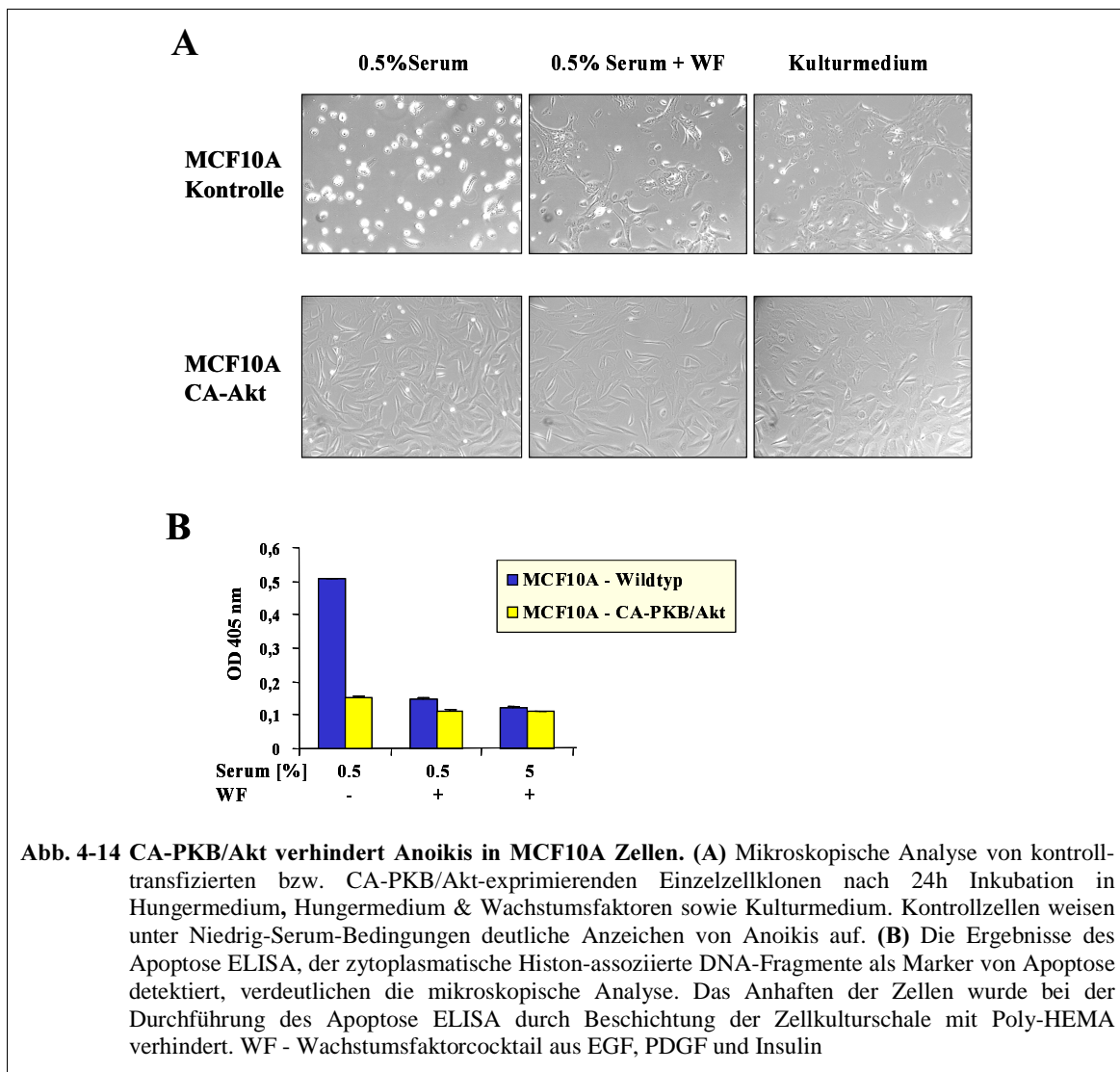


#### 4.2.2. Expression von konstitutiv aktivem PKB/Akt verhindert Anoikis in MCF10A Zellen

Nach der erfolgreichen Etablierung und Charakterisierung von CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien, sollten nun zelluläre Effekte untersucht werden, die durch konstitutive Aktivierung von PKB/Akt hervorgerufen werden. Nicht-transformierte Zellen unterlaufen in Zellkultur



normalerweise Apoptose, wenn sie die Anhaftung an extrazelluläre Matrix verlieren. Dieser Vorgang wird als Anoikis bezeichnet [167]. Tumorzellen müssen Mechanismen entwickelt haben, um sich aus ihrer normalen Umgebung zu lösen und in andere Gewebe einzuwandern ohne Anoikis zu unterlaufen. Da die Anhaftung von membranständigen Integrinen an extrazelluläre Matrix ein Überlebenssignal durch die Aktivierung der PI<sub>3</sub>-Kinase vermittelt [168], wurden kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende Einzelzellklone der immortalisierten aber nicht transformierten Brustepithel-Zelllinie MCF10A auf die Unterdrückung von Anoikis untersucht.



Dazu wurden jeweils drei Ansätze von kontroll-transfizierten bzw. CA-PKB/Akt-exprimierenden Einzelzellklonen in großem Volumen (3ml) Hungermedium, Hungermedium & Wachstumsfaktoren sowie Kulturmedium in 6-Loch-Platten ausgesät und für 24h inkubiert. Die mikroskopische Analyse in Abbildung 4-14A offenbart, dass Kontrollzellen unter

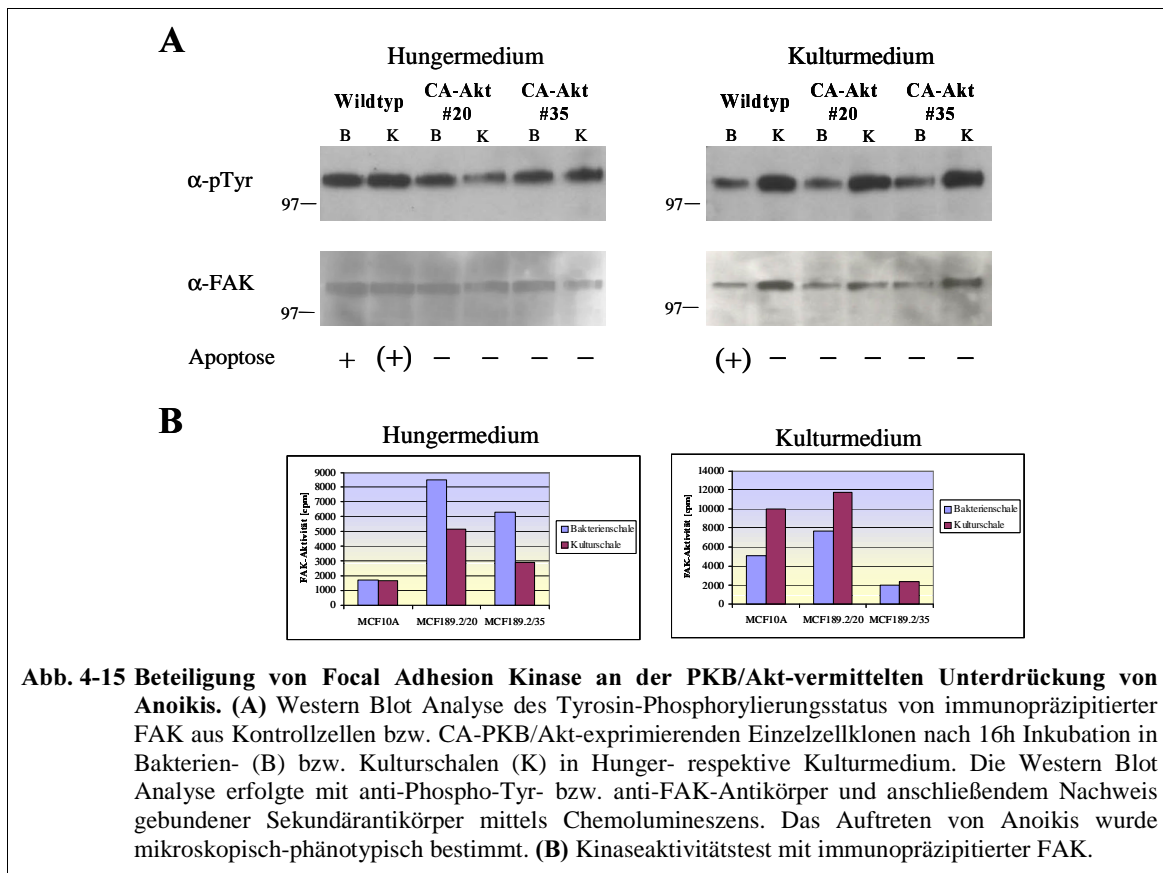
Hungerbedingungen deutliche Anzeichen für das Auftreten von Anoikis zeigten, während CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen auch unter diesen Bedingungen unbeeinflusst blieben. Zugabe von Wachstumsfaktoren (mittlere Bilder) bzw. Kompletmedium (rechte Bilder) unterdrückten das Erscheinen von Anoikis sowohl in Kontrollzellen als auch CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich bei der Durchführung eines Apoptose ELISA, der zytoplasmatische Histone-assoziierte DNA-Fragmente erkennt, die als phänotypische Marker von Apoptose gelten (Abb. 4-14B). Kontrollzellen unterliefen unter Hungerbedingungen Anoikis, was sich durch das Auftreten dieses Apoptose-Markers beobachten ließ. Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren ließ sich auch in diesem Experiment das Auftreten von Anoikis und somit auch von DNA-Fragmentierung in Kontrollzellen verhindern. CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen wiesen hingegen unter sämtlichen Kulturbedingungen keine phänotypischen Marker von Anoikis oder Apoptose auf.

Diese Experimente zeigen, dass immortalisierte MCF10A Zellen unter bestimmten Kulturbedingungen Anoikis unterlaufen können, wenn die Matrix-Anhaftung der Zellen verloren geht. Die Expression von konstitutiv aktiver PKB/Akt-Kinase ist ausreichend, um das Auftreten von Anoikis in MCF10A Zellen zu unterdrücken.

Zur Klärung, ob eine Aktivierung der Focal Adhesion Kinase (FAK), einer Tyrosinkinase, die in den Fokalkontakten an der Weiterleitung von Signalen der Integrine beteiligt ist [180], mit der PKB/Akt-vermittelten Unterdrückung von Anoikis einhergeht, wurden kontrolltransfizierte bzw. CA-PKB/Akt-exprimierende Einzelzellklone unter verschiedenen Kulturbedingungen inkubiert, FAK immunopräzipitiert und Kinaseaktivitätstests mit Poly-Glu-Tyr als artifiziellem Substrat durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.13.). Abbildung 4-15A zeigt den Tyrosin-Phosphorylierungsstatus von immunopräzipitierter FAK unter verschiedenen Kulturbedingungen, während in Abbildung 4-15B die jeweilige Kinaseaktivität von FAK dargestellt ist.

Nach Kultivierung der Kontrollzelllinie in Hungermedium war FAK sowohl ohne als auch mit Matrix-Anhaftung in gleichem Maße phosphoryliert, zeigte aber im Aktivitätstest nur eine relativ geringe Kinaseaktivität. In CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen war in Bakterien-schalen (keine Matrix-Anhaftung der Zellen) sowohl ein höherer Phosphorylierungsgrad als auch eine höhere Kinaseaktivität im Vergleich zur Kultivierung in Kulturschalen (Matrix-Anhaftung der Zellen) zu beobachten. Die FAK-Kinaseaktivität in den CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien war insgesamt deutlich höher als in den Kontrollzellen. Generell war jedoch in allen Ansätzen zu erkennen, dass FAK in Zellen ohne Matrix-Anhaftung stärkere Kinaseaktivität aufwies als in Zellen mit Matrix-Anhaftung.

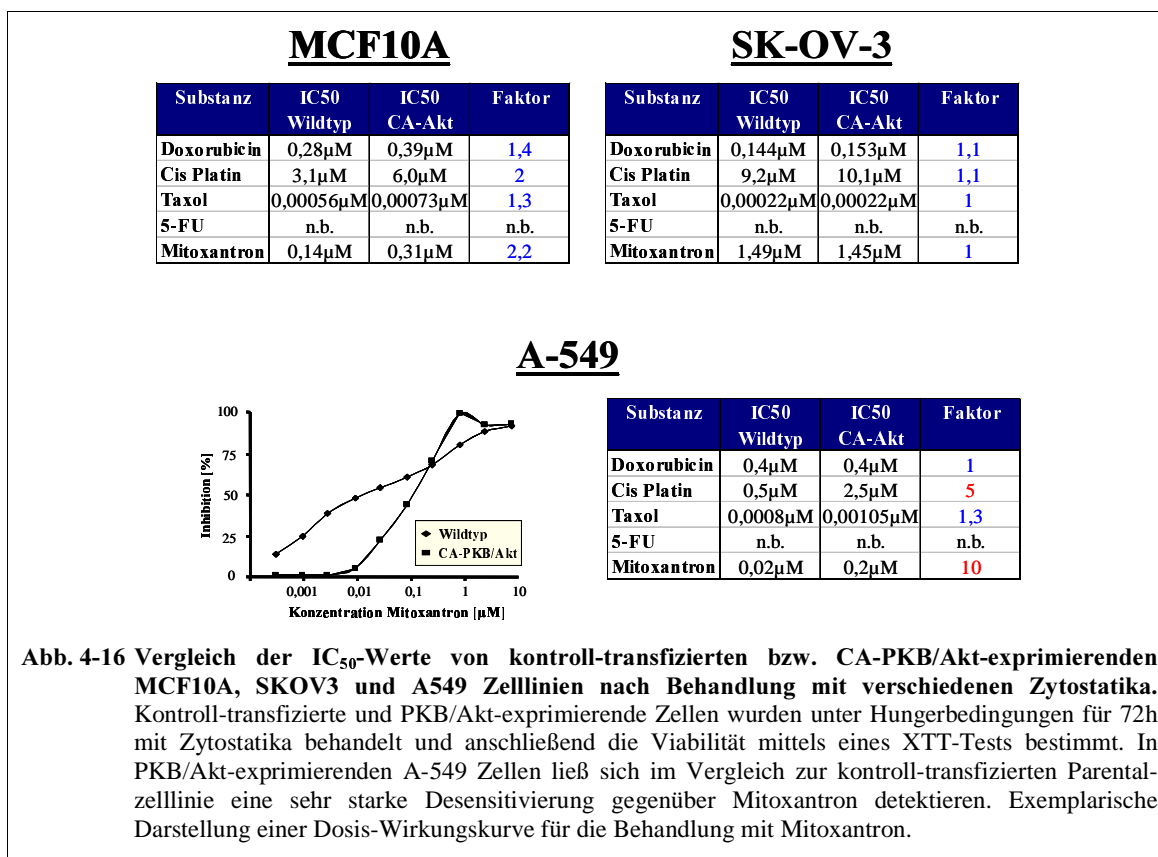
Unter Kulturmedium-Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrollzellen und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien. Sowohl der Phosphorylierungsgrad als auch die Kinaseaktivität von FAK war jeweils vergleichsweise höher, wenn die Zellen an der Matrix anhafteten als wenn sie nicht anhaften konnten. Ebenso war die FAK-Kinaseaktivität in Kulturmedium deutlich höher als in Hungermedium. Unter Kulturbedingungen scheinen daher andere Faktoren eine Aktivierung von FAK zu bewirken als unter Hungerbedingungen.



Die Ergebnisse zeigen, dass in Kontrollzellen, die unter Hungerbedingungen Anoikis unterlaufen, FAK auch bei Matrix-Anhaftung stark phosphoryliert ist. Die Kinaseaktivität ist allerdings niedriger als in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen. Insgesamt scheint FAK nur eine untergeordnete Rolle in der Unterdrückung von Anoikis durch PKB/Akt zu spielen.

### 4.2.3. Vermittlung von Chemoresistenz durch Expression von konstitutiv aktivem PKB/Akt

Neben der Verhinderung von Anoikis und der Vermittlung anti-apoptotischer Signale scheint die Kinase PKB/Akt auch beim Auftreten von Chemoresistenz beteiligt zu sein. So zeigten sich ovariale Tumorzellen, die konstitutiv aktives PKB/Akt exprimierten oder eine Amplifikation des Akt2-Gens aufwiesen, gegenüber der Behandlung mit Paclitaxel deutlich weniger sensitiv als Tumorzellen, die eine niedrige PKB/Akt Expression besaßen [114]. Die molekularen Zusammenhänge der anti-apoptotischen Wirkung von PKB/Akt sind in der Literatur sehr ausführlich beschrieben, es gibt jedoch nur wenige Daten, die eine direkte Beteiligung von PKB/Akt bei der Vermittlung von Chemoresistenz belegen. Daher sollte überprüft werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der konstitutiven Aktivierung von PKB/Akt und der Desensitivierung gegenüber Chemotherapeutika besteht.



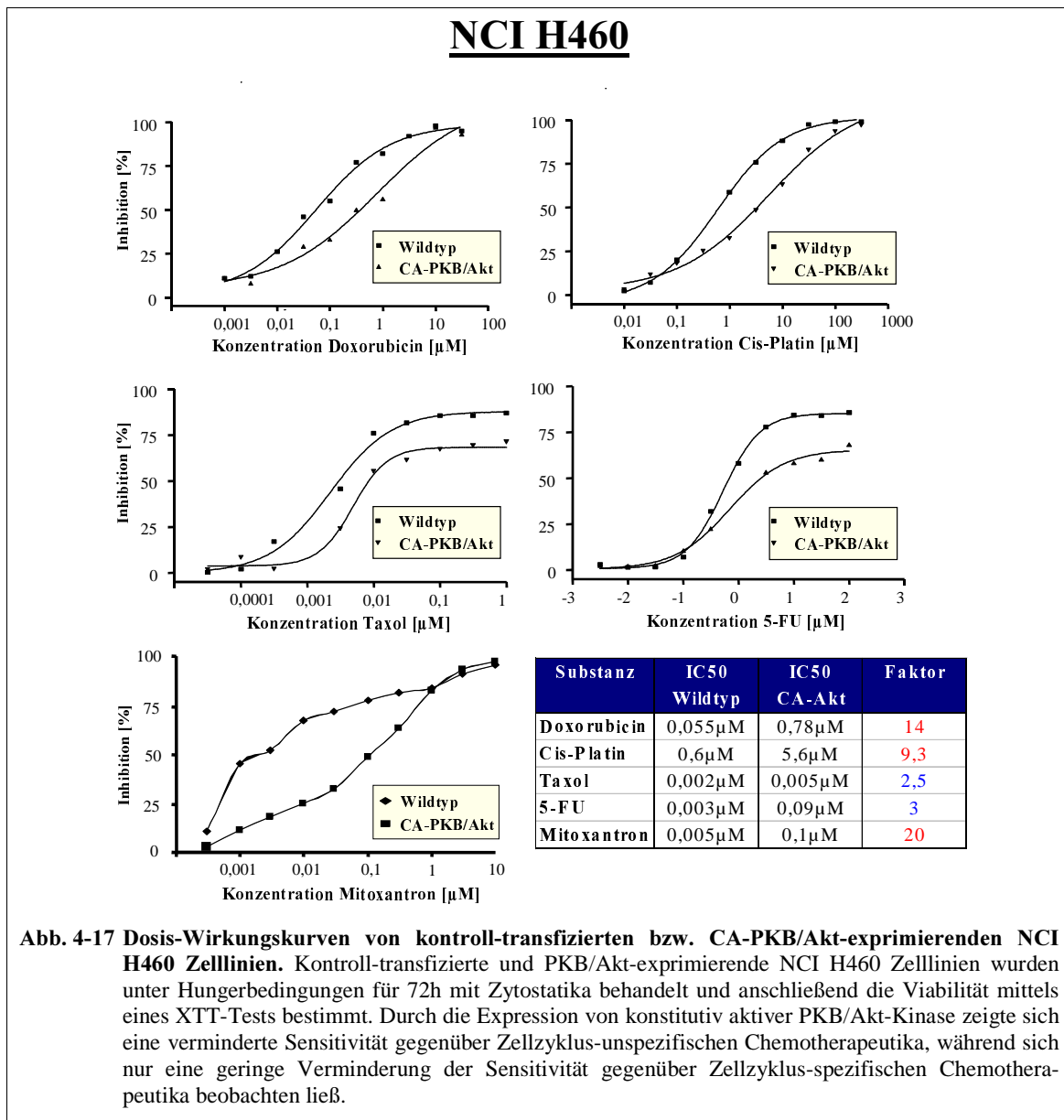
CA-PKB/Akt-exprimierende MCF10A, SK-OV-3, A-549 und NCI H460 Zelllinien wurden im Vergleich mit ihren kontroll-transfizierten Parentalzelllinien hinsichtlich ihres Ansprechens auf verschiedene Chemotherapeutika untersucht (siehe Abschnitt 3.3.8.). Abbildung 4-16 zeigt die Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>-Werte der kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien bei Behandlung mit verschiedenen Zellzyklus-

spezifischen (Taxol, 5-FU) bzw. Zellzyklus-unspezifischen Chemotherapeutika (Mitoxantron, Cis Platin, Doxorubicin). Für die Substanz 5-FU ließen sich weder in MCF10A noch in SK-OV-3 oder A-549 Zelllinien  $IC_{50}$ -Werte bestimmen, da sich diese Zelllinien bei den verwendeten Inkubationszeiten auch bei Konzentrationen bis  $316\mu\text{M}$  nicht oder nur schwach sensitiv gegenüber diesem Chemotherapeutikum zeigten. Die Experimente zur Bestimmung der Chemosensitivität wurden jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander und mit verschiedenen CA-PKB/Akt-exprimierenden Klonen reproduziert, um klonale Effekte und Artefakte auszuschließen.

CA-PKB/Akt-exprimierende MCF10A Zellen wiesen im Vergleich zur Kontrollzelllinie eine schwache Desensitivierung gegenüber den getesteten Chemotherapeutika auf. Für Mitoxantron und Cis Platin konnte hierbei die größte Verschiebung der  $IC_{50}$  um den Faktor 2,2 bzw. 2 beobachtet werden. In CA-PKB/Akt-exprimierenden bzw. kontroll-transfizierten SK-OV-3 Zelllinien ließen sich keine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den getesteten Chemotherapeutika detektieren. Für CA-PKB/Akt-exprimierende A-549 Zelllinien konnte eine starke Desensitivierung gegenüber Mitoxantron (Faktor 10) und Cis Platin (Faktor 5) im Vergleich zur Kontrollzelllinie beobachtet werden, während sich für Doxorubicin und Taxol keine bzw. nur eine minimale Verschiebung der  $IC_{50}$ -Werte ergab.

Die stärkste Desensitivierung gegenüber den getesteten Chemotherapeutika konnte in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zelllinien detektiert werden (Abb. 4-17). Für die Zellzyklus-unspezifischen Chemotherapeutika Mitoxantron, Doxorubicin und Cis Platin zeigte sich im Vergleich zur Kontrollzelllinie eine sehr starke Verschiebung der  $IC_{50}$ -Werte um den Faktor 20, 14 bzw. 9,3. Für Zellzyklus-spezifisches Taxol bzw. 5-FU ließen sich lediglich schwächere Verschiebungen der  $IC_{50}$ -Werte um den Faktor 2,5 bzw. 3 beobachten.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass konstitutive Aktivierung von PKB/Akt zur Desensitivierung der Zelllinien MCF10A, A-549 und NCI H460 gegenüber Chemotherapeutika führt. Insbesondere in NCI H460 Zellen waren die  $IC_{50}$ -Werte von Mitoxantron, Doxorubicin und Cis Platin durch die Expression von konstitutiv aktiver PKB/Akt-Kinase deutlich erhöht. Die Zelllinie SK-OV-3 weist unter Hungerbedingungen bereits eine sehr hohe endogene PKB/Akt-Kinaseaktivität auf (siehe Abb. 4-12A), so dass die zusätzliche Expression von ektopischem CA-PKB/Akt keine weitere Desensitivierung gegenüber Chemotherapeutika nach sich zieht. In weiteren Experimenten sollten nun die molekularen Mechanismen der Desensitivierung von CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen gegenüber Mitoxantron und Cis Platin untersucht werden.



#### 4.2.4. Mechanistische Charakterisierung der Chemoresistenz in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen

Die meisten der heute in der Klinik verwendeten Chemotherapeutika töten Tumorzellen über die Induktion von Apoptose [173]. Bei der Auslösung von Apoptose werden verschiedene Signalwege unterschieden. Ein Weg umfasst die Auslösung von Apoptose durch membranständige Rezeptoren (sogenannte Todesrezeptoren) wie beispielsweise TNF $\alpha$ - oder Fas-Rezeptoren, die nach Bindung ihres Liganden Adaptermoleküle rekrutieren und so den Ablauf einer Caspase-Kaskade einleiten, was schließlich zum Absterben der Zelle führt (siehe Abb. 1-5 und 1-6) [66]. Zytostatika können hierbei indirekt die Expression von Liganden der

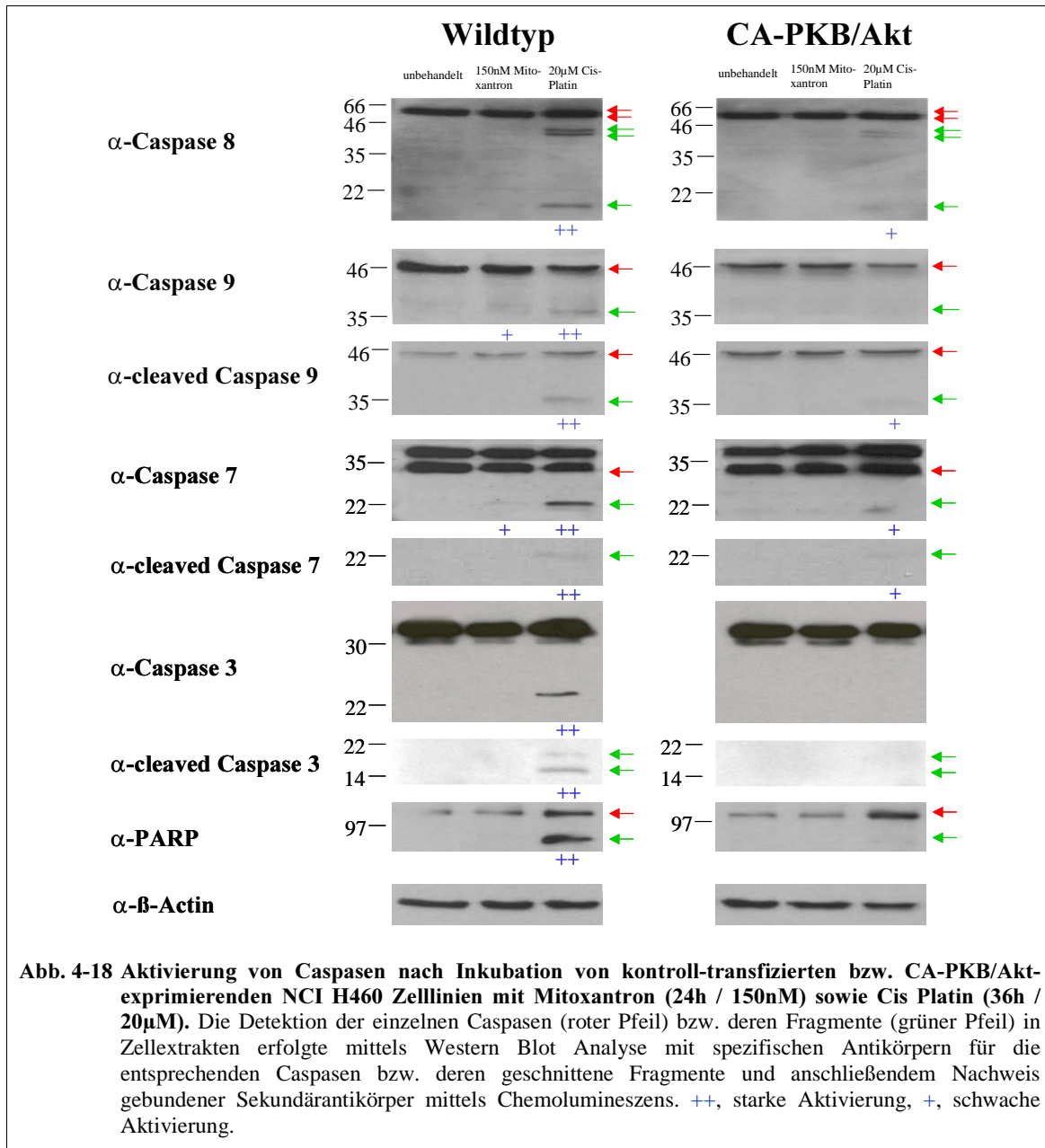
Todesrezeptoren induzieren (z.B. Fas-L) oder das Adaptermolekül FADD in den „Death-inducing signaling complex“ (DISC) rekrutieren und somit den Todesrezeptor-Signalweg aktivieren [173]. Ein weiterer Signalweg zur Auslösung von Apoptose wird durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch andere Stresssignale ausgelöst. Proteine der Bcl-2 Familie regulieren hierbei die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, was wiederum eine Caspase-Kaskade initiiert, die schließlich zu Apoptose führt [66]. So sorgen verschiedene Zytostatika indirekt für die Induktion der Expression von Bax, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie und somit für eine Verschiebung der Balance innerhalb der Zelle in Richtung Apoptose [181]. Als Antwort auf das Auftreten von DNA-Schäden nach Behandlung mit Chemotherapeutika, die beispielsweise DNA alkylieren und quervernetzen, wird das Tumorsuppressorprotein p53 an mehreren Serinresten durch verschiedene Serin-/ Threonin-Kinasen wie ATM, ATR, DNA-PK oder Chk2 phosphoryliert und aktiviert (siehe Abb. 1-9) [97-109]. Nach seiner Aktivierung kann p53 in den Zellkern translozieren und dort durch Transkription verschiedener Gene zum einen Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur zum anderen aber auch Apoptose induzieren [106]. Charakteristisch für alle Signalwege zur Auslösung von Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen [67-69]. Diese Cystein-Proteasen werden in der Zelle als inaktive Zymogene synthetisiert, die durch proteolytische Abspaltung der Pro-Domäne aktiviert werden [68]. Innerhalb der proteolytischen Kaskade werden je nach ihrer Aufgabe die Initiator-Caspase 8, 9, 10 und die Effektor-Caspasen 2-7 und 11-13 unterschieden, wobei die Effektor-Caspasen an der Spaltung zellulärer Proteine und somit der Einleitung von Apoptose beteiligt sind (siehe Abb. 1-5) [68]. PKB/Akt kann apoptotische Stimuli unterdrücken, indem es in diese Signalwege eingreift. So werden u.a. die Initiator-Caspase 9, das pro-apoptotische Bcl-2-Homolog Bad und Forkhead Transkriptionsfaktoren, die die Expression des Fas-L modulieren, durch PKB/Akt direkt phosphoryliert und in ihrer Funktion inaktiviert (siehe Abb. 1-11) [116].

#### **Aktivierung von Caspasen nach Behandlung mit Zytostatika**

Zur mechanistischen Untersuchung der durch CA-PKB/Akt hervorgerufenen Desensitivierung insbesondere gegenüber den Chemotherapeutika Mitoxantron und Cis Platin in NCI H460 Zelllinien wurde zuerst die Aktivierung verschiedener Caspasen sowie des Caspase 3/7-Substrates PARP in der Western Blot Analyse betrachtet (Abb. 4-18).

Dazu wurden zunächst aus den Dosis-Wirkungskurven der mit Mitoxantron und Cis Platin behandelten kontroll-transfizierten NCI H460 Zellen  $IC_{80}$ -Werte bestimmt. Da bei der Bestimmung der Dosis-Wirkungskurven die Substanz-Inkubationsdauer 72h betrug, wurde für die Analyse der Caspase-Signalwege als Konzentration die  $IC_{80}$  gewählt, um auch bei

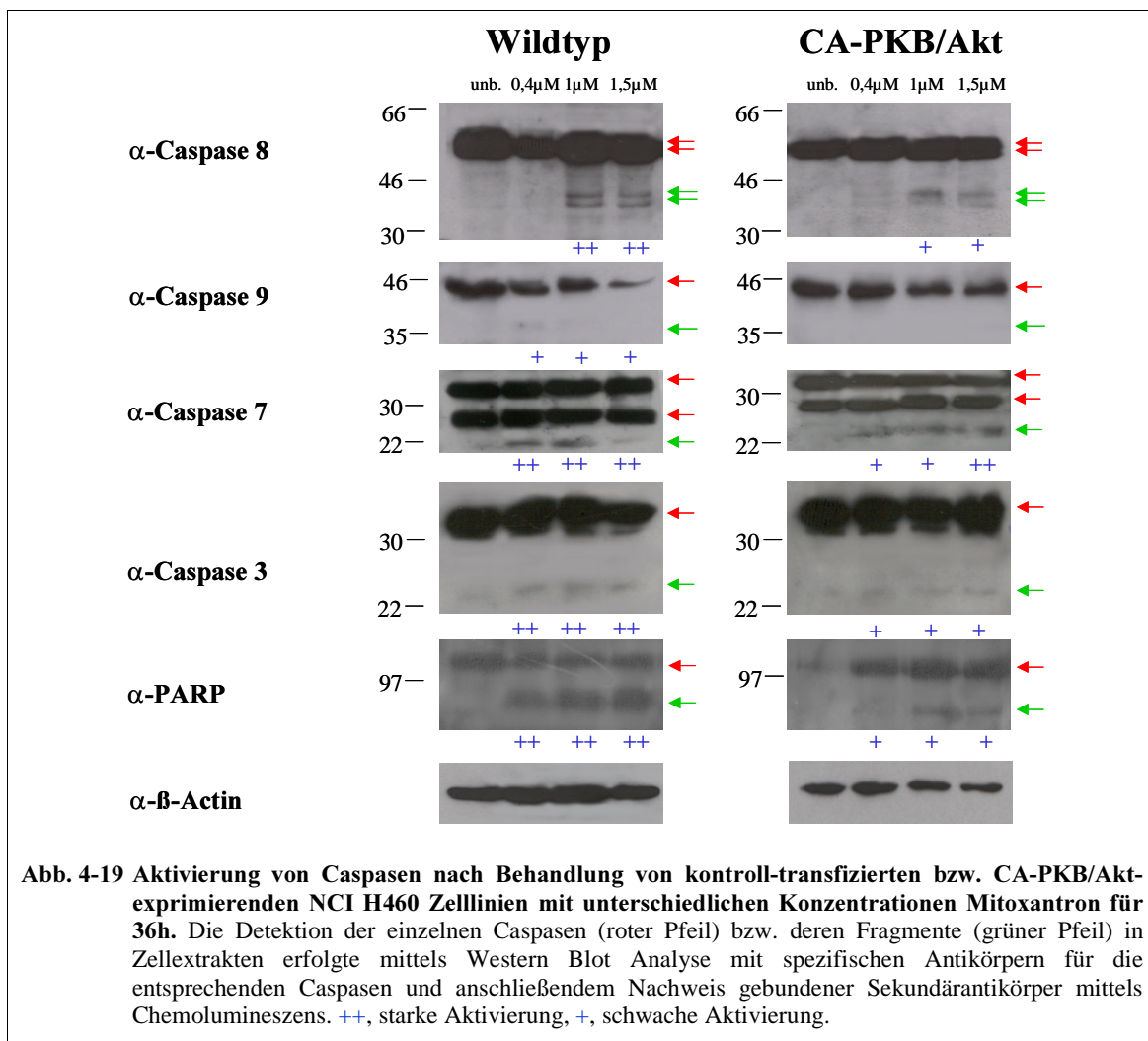
kürzerer Inkubationszeit in den Kontrollzellen eine starke Caspase-Aktivierung zu erreichen und eventuelle Unterschiede zu CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen deutlich zu erkennen [169]. Die optimale Inkubationszeit der Zelllinien mit Mitoxantron (24h) respektive Cis Platin (36h) wurde mittels Apoptose-ELISA sowie Western Blot Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (Daten nicht gezeigt).



In Cis Platin behandelten Kontrollzellen ließ sich eine starke Aktivierung der beiden Schlüssel-Caspasen 8 und 9, der Effektor-Caspasen 3 und 7 sowie des Caspase-Substrates PARP beobachten, während sich in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen nur eine wesentlich schwächere Aktivierung der Schlüssel-Caspasen 8 und 9 sowie der Effektor-Caspase 7 aber



keine Aktivierung von Caspase 3 und Spaltung von PARP zeigte. Nach Behandlung der Kontrollzellen mit 150nM Mitoxantron für 24h ließ sich lediglich eine sehr schwache Aktivierung von Caspase 9 und 7 beobachten, während die anderen analysierten Caspasen nur im ungeschnittenen Zustand vorlagen. In CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen hingegen kam es durch die Behandlung mit Mitoxantron zu keiner nachweisbaren Caspase-Aktivierung. Insgesamt ließen sich bei Behandlung der Zelllinien mit Cis Platin quantitative Unterschiede in der Aktivierung der Caspasen 8, 9 und 7 sowie qualitative Divergenzen in der Spaltung von Caspase 3 sowie des Substrats PARP detektieren, während sich bei Behandlung der Zelllinien mit Mitoxantron schwache qualitative Differenzen ausschließlich hinsichtlich der Aktivierung von Caspase 9 und 7 zeigten.



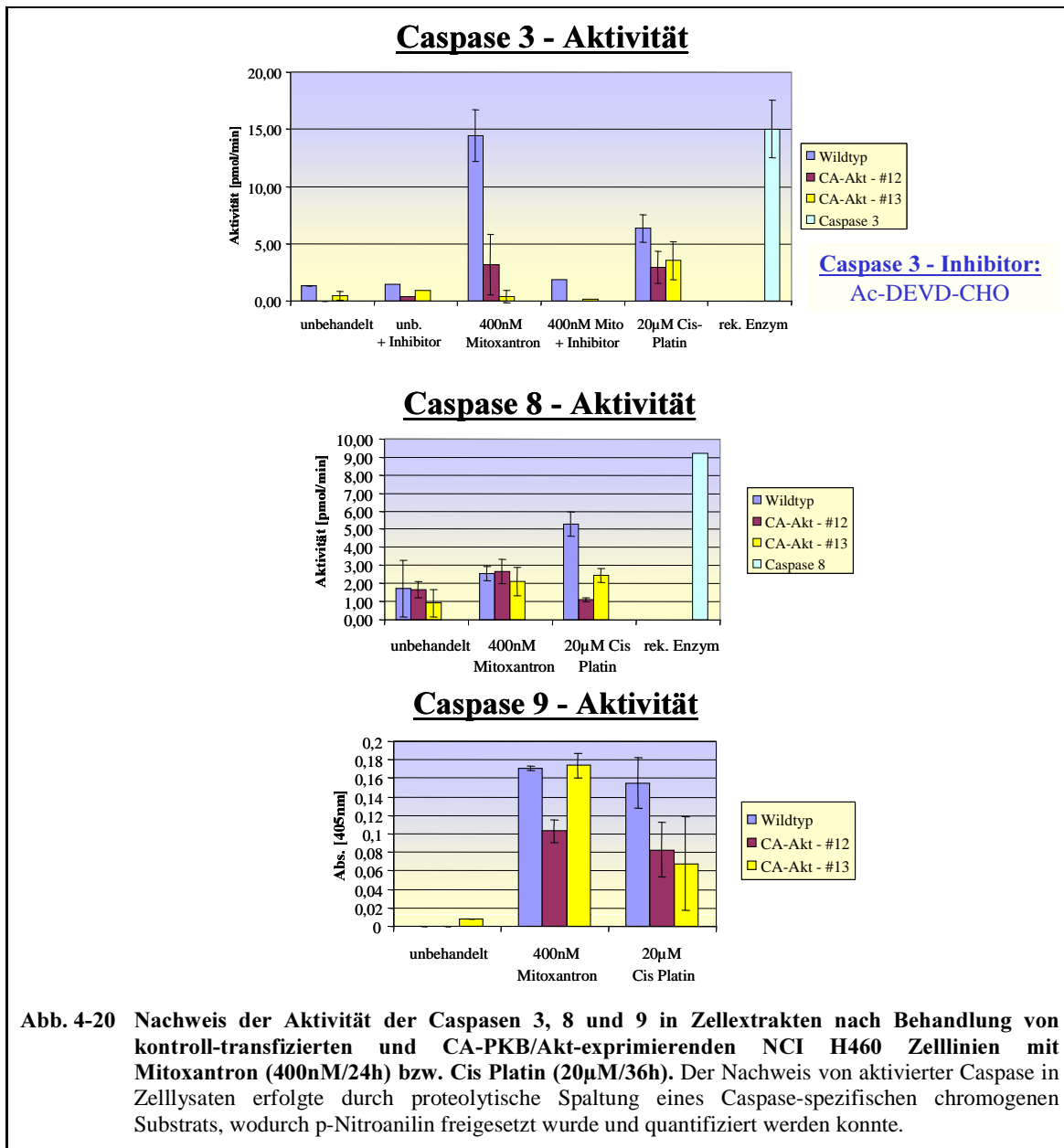
Um die Unterschiede in der Aktivierung der einzelnen Caspasen zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien bei Behandlung mit Mitoxantron genauer untersuchen zu können, wurde der Versuch mit höheren Mitoxantron-

Konzentrationen (400nM, 1µM bzw. 1,5µM) und verlängerter Inkubationsdauer (36h) wiederholt (Abb. 4-19). Die augenscheinlichsten Unterschiede zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen zeigten sich wiederum in der Aktivierung der Effektor-Caspasen 3/7 sowie in der Spaltung von PARP, die in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen bei allen Konzentrationen schwächer ausfielen. Eine Aktivierung von Caspase 8 erfolgte in beiden Zelllinien nur ab einer Konzentration von 1µM, wobei diese in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen ebenfalls geringfügig schwächer zu beobachten war. Für Caspase 9 ergab sich eine schwache Aktivierung in Kontrollzellen, während es in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen zu keiner Spaltung (und damit Aktivierung) dieser Schlüssel-Caspase kam. Auch in diesem Experiment ließen sich Unterschiede in der Aktivierung der Caspasen beobachten, wobei sich die Ergebnisse bei Behandlung mit Cis Platin eindeutiger als bei Behandlung mit Mitoxantron darstellten. Die Aktivierung von Caspasen war bei Behandlung mit Mitoxantron allgemein schwächer und wurde größtenteils erst bei Konzentrationen erreicht, die höher als der IC<sub>80</sub>-Wert lagen.

Um die Aktivierung der beiden Schlüssel-Caspasen 8/9 sowie der Effektor-Caspase 3 quantifizieren zu können, wurden Aktivitätstests mit Lysaten von kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zelllinien nach Behandlung mit Mitoxantron (24h / 400nM) und Cis Platin (36h / 20µM) bzw. ohne Zytostatika-Behandlung durchgeführt (siehe Abschnitte 3.4.15.-3.4.17.). Der Nachweis von aktivierter Caspase in Zelllysaten erfolgte durch proteolytische Spaltung eines Caspase-spezifischen chromogenen Substrats, wodurch p-Nitroanilin freigesetzt wird und quantifiziert werden kann. Die Ergebnisse dieser Caspase-Aktivitätstests sind in Abbildung 4-20 zusammengefasst.

Durch Inkubation der Kontrollzellen mit 400nM Mitoxantron für 24h ließ sich in Zellextrakten eine Caspase 3 Aktivität von 14,6pmol/min detektieren, die nahezu der Aktivität von 30U rekombinanter Caspase 3 entsprach. Nach Zugabe eines spezifischen Caspase 3 Inhibitors ließ sich in den Zellextrakten nahezu keine Caspase 3 Aktivität detektieren, was die Spezifität des chromogenen Substrats für Caspase 3 verdeutlicht. In CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien ließ sich nur eine schwache Steigerung der Caspase 3 Aktivität nach Behandlung mit Mitoxantron beobachten. Es fiel darüber hinaus auf, dass die Unterschiede zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien nach Mitoxantron-Behandlung im Aktivitätstest deutlicher zu erkennen waren als in der Western Blot Analyse (siehe Abb. 4-19). Auch nach Behandlung der Zelllinien mit 20µM Cis Platin für die Dauer von 36h zeigte sich in Kontrollzellen eine deutlich stärkere Aktivierung der Effektor-Caspase 3 im Vergleich zu CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien.

Analog zur Western Blot Analyse konnte im Aktivitätstest sowohl für kontroll-transfizierte als auch CA-PKB/Akt-exprimierende Zelllinien nur eine sehr geringe Caspase 8 Aktivierung nach Behandlung mit 400nM Mitoxantron gemessen werden. Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien in der Caspase 8 Aktivierung traten hingegen - wie schon in Abbildung 4-18 zu sehen - bei Inkubation mit 20µM Cis Platin auf. Während in Kontrollzellen die Caspase 8 Aktivität 5,3pmol/min betrug, ließ sich die Aktivität zweier CA-PKB/Akt-exprimierender Klone auf nur 1,1 bzw. 2,4pmol/min bestimmen.



Im Caspase 9 Aktivitätstest konnte nach der Behandlung der Zelllinien mit 400nM Mitoxantron in Kontrollzellen eine deutliche Aktivierung beobachtet werden. In PKB/Akt-

exprimierenden Zellen ergab sich auch bei mehrfacher Wiederholung des Experiments kein eindeutiges Bild. Wie bereits in der Western Blot Analyse (Abb. 4-18 und 4-19) zeigte sich, dass die Aktivierung von Caspase 9 in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien tendenziell eher niedriger als in Kontrollzellen war. Nach Behandlung der Zelllinien mit 20 $\mu$ M Cis Platin ließ sich eine signifikant stärkere Aktivierung von Caspase 9 in kontroll-transfizierten Zellen im Vergleich zu CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen detektieren.

Alle Caspase-Aktivitätstests wurden mit vergleichbaren Ergebnissen mehrmals reproduziert. Die bereits in der Western Blot Analyse gefundene differenzielle Aktivierung der einzelnen Caspasen konnte in den Aktivitätstests erneut beobachtet werden, wobei in Analogie zur Western Blot Analyse auch hier die Unterschiede in Cis Platin behandelten Zelllinien deutlicher hervortraten als in Mitoxantron behandelten Zelllinien.

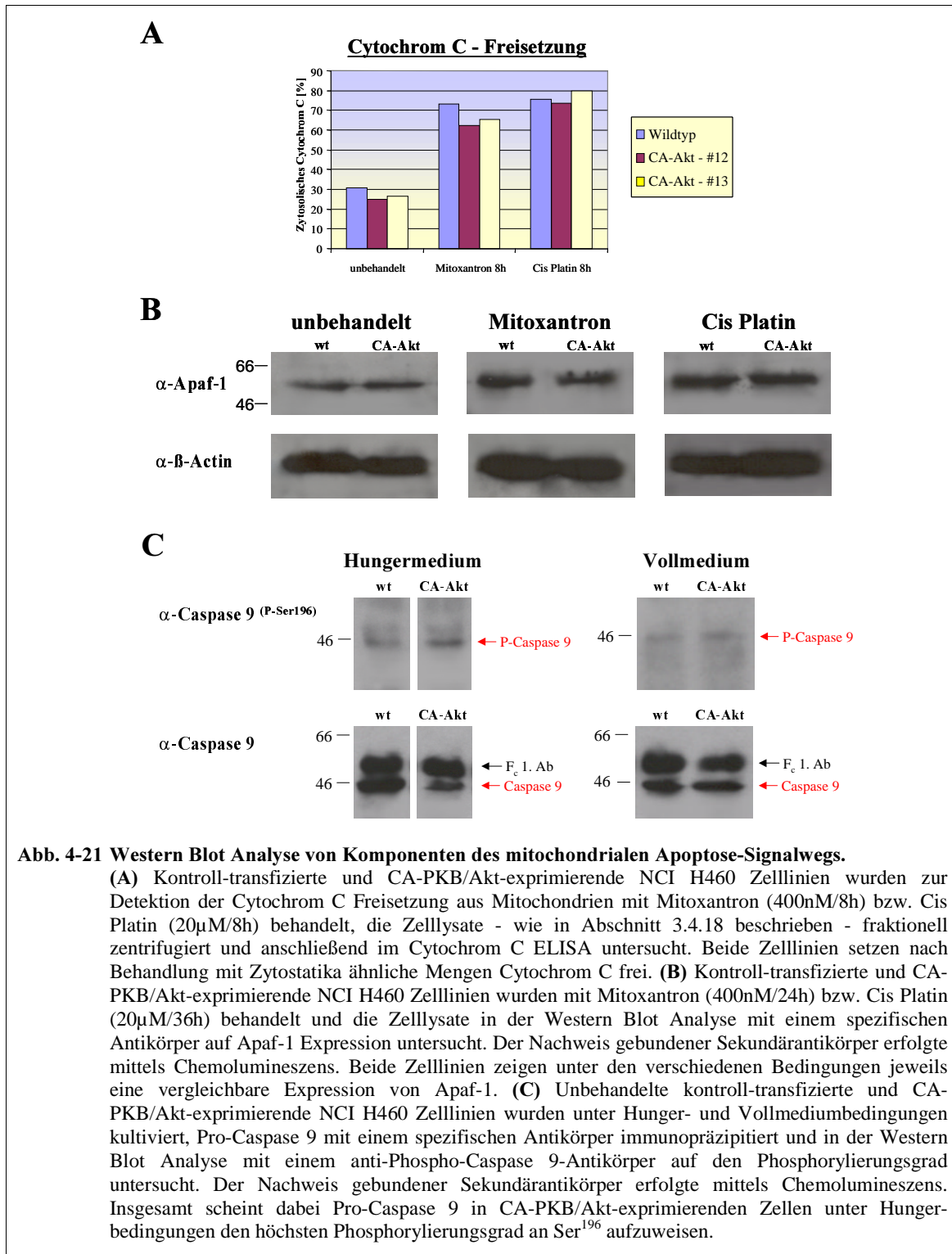
Zusammenfassend lässt sich aus den Caspase-Aktivierungsstudien ableiten, dass nach der Behandlung mit Zytostatika die Caspase-Aktivität in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen tendenziell niedriger war als in Kontrollzellen. Da hierbei sowohl der mitochondriale Signalweg durch Spaltung der Initiator-Caspase 9 als auch der Todesrezeptor-Signalweg über Proteolyse der Initiator-Caspase 8 aktiviert zu sein scheint, sollten nun beide Signalwege zur Aufklärung der molekularen Unterschiede der Caspase-Aktivierung zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien eingehender untersucht werden.

### **Molekulare Untersuchung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs**

Zunächst wurden daher verschiedene Mechanismen des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs - wie bereits in Abbildung 1-7 dargestellt - betrachtet. Der initiale Schritt der Caspase 9 Aktivierung ist die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol. Zur Bestimmung der Cytochrom C-Verteilung wurden Lysate von unbehandelten sowie Mitoxantron- (8h / 400nM) bzw. Cis Platin-behandelten (8h / 20 $\mu$ M) kontroll-transfizierten bzw. CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien fraktionell zentrifugiert. Anschließend wurde die Cytochrom C-Konzentration der mitochondrialen und der zytosolischen Fraktion im ELISA quantifiziert (siehe Abschnitt 3.4.18). Aus Abbildung 4-21A geht hervor, dass es durch Behandlung der Zelllinien mit beiden Zytostatika im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einer deutlichen Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol kommt. Diese Freisetzung ist aber in kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen vergleichbar stark.

Zytosolisches Cytochrom C kann nach seiner Freisetzung an Apaf-1 binden. Gemeinsam mit Caspase 9 aggregiert dieser Komplex zum „Apoptosom“, wobei es zur Aktivierung von Caspase 9 kommt [90]. Da Unterschiede der Caspase 9 Aktivierung in einer ungleichen

Expressionsrate von Apaf-1 begründet sein könnten, wurden kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende Zelllinien im unbehandelten und Zytostatika-behandelten Zustand auf die Expression von Apaf-1 untersucht.



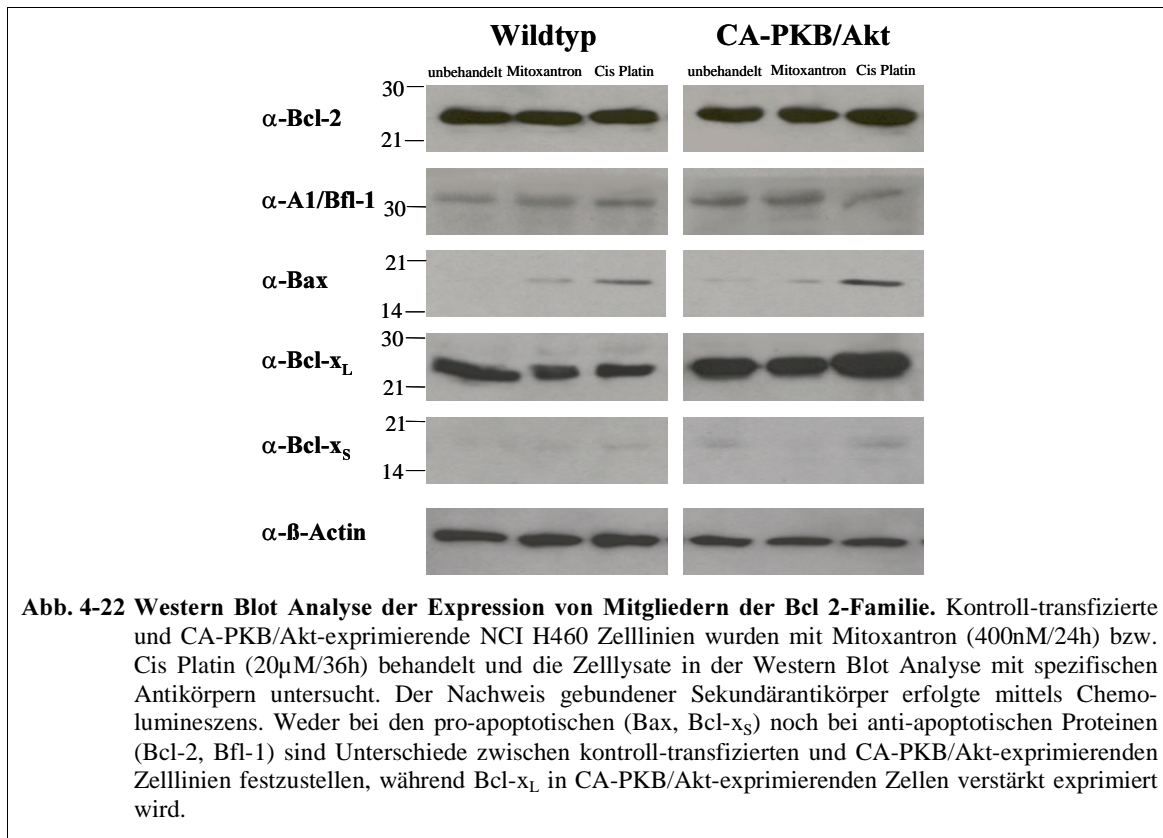
Durch Behandlung der Zellen mit Mitoxantron und Cis Platin erfolgte eine Induktion der Apaf-1-Expression. Diese Induktion war allerdings in kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien vergleichbar stark, so dass auch hier keine molekularen Unterschiede zwischen Kontrollzellen und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen detektiert werden konnten (Abb. 4-21B).

Ein weiterer beschriebener Mechanismus, der zu einer schwächeren Aktivierung von Pro-Caspase 9 führt, ist die Phosphorylierung von Pro-Caspase 9 an Ser<sup>196</sup> durch PKB/Akt. Diese Phosphorylierung verhindert die Spaltung von Pro-Caspase 9 und somit die Initiation der proteolytischen Caspase-Kaskade [171]. Daher wurde Pro-Caspase 9 mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und anschließend auf seinen Phosphorylierungsstatus überprüft. Insbesondere unter Hungerbedingungen zeigte sich, dass Pro-Caspase 9 in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen etwas stärker phosphoryliert war als in Kontrollzellen (Abb. 4-21C). In Vollmedium ist dieser Effekt nur in sehr abgeschwächter Form zu beobachten, da der Grad der Phosphorylierung unter diesen Bedingungen insgesamt deutlich niedriger ist. Da die Behandlung der Zellen mit Zytostatika unter Hungerbedingungen durchgeführt wurde, ist es möglich, dass die Aktivierung von Caspase 9 teilweise durch deren verstärkte Phosphorylierung in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen kompensiert wurde.

Die Regulation der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien erfolgt über die Balance zwischen anti- und pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie [83]. Nach Heterodimerisierung können einige dieser Proteine in der mitochondrialen Membran porenartige Komplexe bilden, wobei das Verhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Bcl-2-Homologen darüber entscheidet, ob Cytochrom C freigesetzt wird oder nicht [84-86]. Daher wurden nun die Expressionsmuster von fünf Proteinen dieser Familie in unbehandelten sowie Mitoxantron- (400nM/24h) und Cis Platin-behandelten (20µM/36h) kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien betrachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-22 zusammengefasst.

Die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bfl-1 und Bcl-x<sub>L</sub> war nach Behandlung mit Zytostatika sowohl in Kontrollzellen als auch CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen unverändert. Ein Unterschied in der Expression von Bcl-2 und Bfl-1 zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen konnte nicht beobachtet werden. Die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> hingegen war in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen deutlich erhöht. Keine Expressionsunterschiede ließen sich für die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bcl-x<sub>S</sub> detektieren, wobei die Expression von Bcl-x<sub>S</sub> insgesamt sehr niedrig war. Bei Behandlung der

Zellen mit Zytostatika stieg die Expression von Bax sowohl in kontroll-transfizierten als auch CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen deutlich an.



Insgesamt zeigten sich also keine Expressionsunterschiede für die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bcl-x<sub>S</sub> sowie die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bfl-1 zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien. Ein anti-apoptotisches Signal könnte die verstärkte Expression von Bcl-x<sub>L</sub> in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen darstellen. Darüber hinaus wäre es möglich, dass die Funktionalität einiger Proteine z.B. durch Phosphorylierung herabgesetzt ist, wozu aber weitere Untersuchungen z.B. mit phospho-spezifischen Antikörpern nötig wären.

### Molekulare Untersuchung des Todesrezeptor-vermittelten Apoptose-Signalwegs

In den Caspase-Aktivitätsuntersuchungen konnte nach Behandlung der NCI H460 Zelllinien mit Zytostatika neben der differentiellen Aktivierung der Initiator-Caspase 9 auch eine differenzielle Aktivierung der Initiator-Caspase 8 nachgewiesen werden, weshalb nunmehr verschiedene Mechanismen und Faktoren des Fas-Rezeptor Signalwegs - wie bereits in Abbildung 1-5 dargestellt - untersucht werden sollten. Der Fas-Rezeptor Signalweg spielt in der Zytostatika-vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle [173]. Die Exposition von Zellen mit bestimmten Chemotherapeutika führt zum p53-vermittelten Transport von Fas-R aus dem

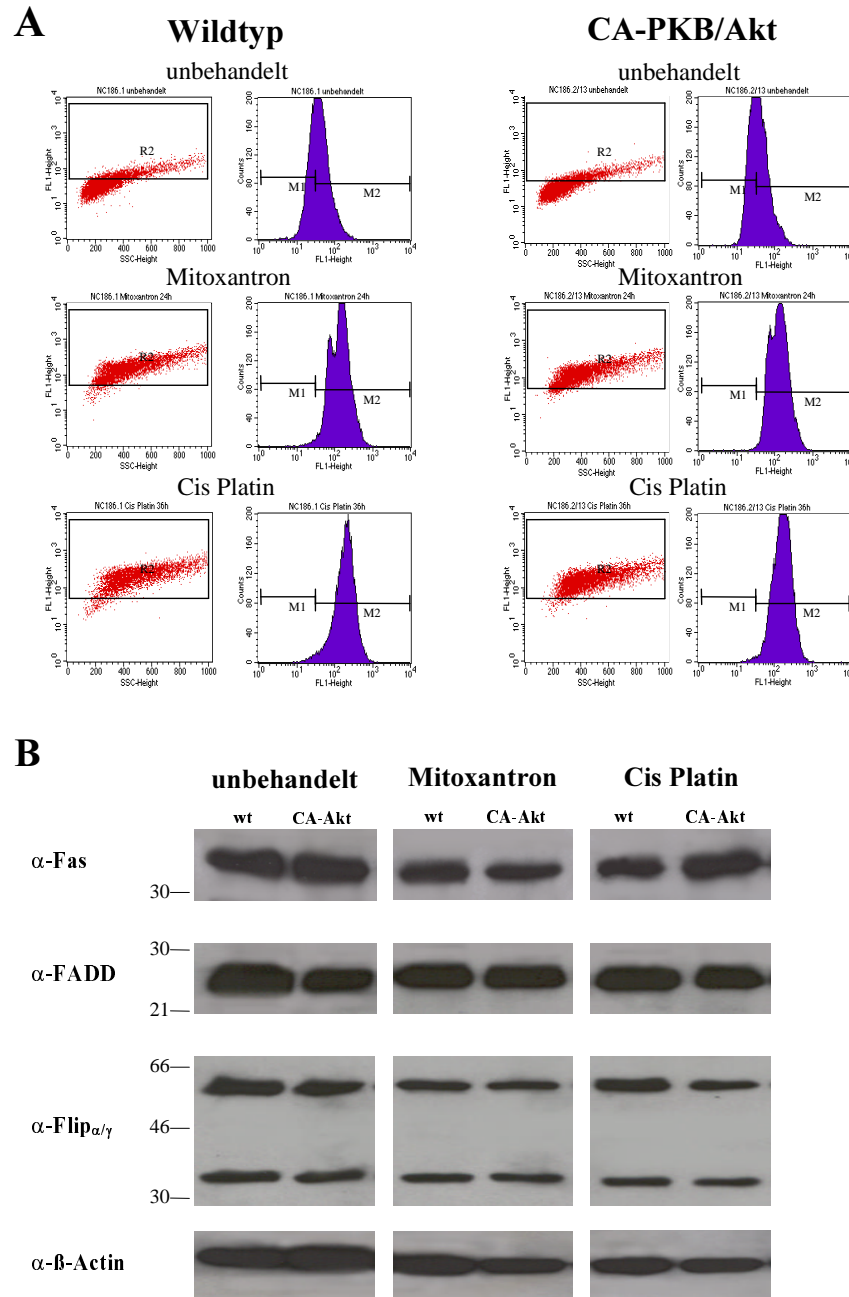
Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, wo diese trimerisieren und somit die Bildung des „Death-inducing signaling complex“ (DISC) aus dem Adaptermolekül FADD und Pro-Caspase 8 induzieren können [174, 175]. Die Aktivierung von Pro-Caspase 8 kann durch die Interaktion von c-FLIP mit dem DISC inhibiert werden [75]. Hieraus ergeben sich mehrere Mechanismen, die eine Desensitivierung gegenüber Zytostatika vermitteln könnten. Zum einen könnte eine unterschiedliche Oberflächenexpression des Fas-R eine geringere Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika bewirken. Zum anderen wäre es denkbar, dass die Expression des Adapterproteins FADD oder aber die Expression des inhibitorischen Proteins c-FLIP verändert und somit die Ausbildung des DISC bzw. die Aktivierung der Pro-Caspase 8 modifiziert sein könnte.

Daher wurde zum einen eine FACS Analyse durchgeführt, bei der die Oberflächenexpression des Fas-R in unbehandelten sowie Mitoxantron- (400nM/24h) und Cis Platin-behandelten (20µM/36h) Zelllinien bestimmt wurde (siehe Abschnitt 3.4.19.). Darüber hinaus wurden in der Western Blot Analyse Gesamtzelllysate auf die Expression von Fas-R, FADD und c-FLIP untersucht.

Fas-Rezeptoren können nur aktiviert werden, wenn sie sich membranständig an der Zelloberfläche befinden. Intrazellulär gespeicherte Fas-Rezeptoren müssen somit nach einem apoptotischen Stimulus zunächst an die Zelloberfläche transportiert werden, ehe sie dort aktiviert werden können. In der FACS Analyse konnte eine deutliche Steigerung der Oberflächenexpression des Fas-R nach Behandlung der Zellen mit Mitoxantron (400nM/24h) bzw. Cis Platin (20µM/36h) im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 4-23A). Kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende Zelllinien wiesen dabei jedoch keine Unterschiede auf.

Nachdem in der FACS Analyse keine Unterschiede in der Zytostatika induzierten Translokation der Fas-Rezeptoren an die Zelloberfläche zu beobachten waren, wurden die behandelten Zellextrakte nun auf Unterschiede in der Expression verschiedener Proteine des Todesrezeptorsignalwegs untersucht. In der Western Blot Analyse wurden dabei keine Unterschiede in der Gesamtexpression von Fas-R, FADD und c-FLIP zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien detektiert (Abb. 4-23B). Auffällig hierbei war, dass die Gesamtproteinmenge des Fas-R auch nach Behandlung der Zelllinien mit Mitoxantron und Cis Platin konstant blieb. Dies bestätigt die Beobachtung, dass im Golgi-Apparat gespeicherte Fas-Rezeptoren nach Zytostatika-Behandlung und damit einhergehender p53-Aktivierung an die Zelloberfläche transportiert werden und keine Protein-Neusynthese stattfindet [175].





**Abb. 4-23 FACS-Analyse der Fas-Rezeptor-Oberflächenexpression und Western Blot Analyse des Fas-Rezeptor-Signalwegs.** (A) Nach Behandlung mit Mitoxantron (24h/400nM) bzw. Cis Platin (36h/20 $\mu$ M) wurden kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zellen mit EDTA/PBS von der Schale abgelöst, fixiert und membranständige Fas-Rezeptoren mit einem FITC-markierten Antikörper im Durchflusszytometer nachgewiesen. (B) Behandelte Zelllysate wurden außerdem einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen Fas-R, FADD und c-FLIP unterzogen. Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels Chemolumineszenz. Es konnten hierbei keine Unterschiede zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien hinsichtlich der Oberflächenexpression des Fas-Rezeptors (A) sowie der Gesamtexpression von Fas-R, FADD und c-FLIP (B) detektiert werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich bei der Analyse des Fas-Rezeptor Signalwegs keine Unterschiede hinsichtlich der Translokation der Fas-Rezeptoren an die Zelloberfläche

und der Expression von Proteinen des DISC zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien zeigten.

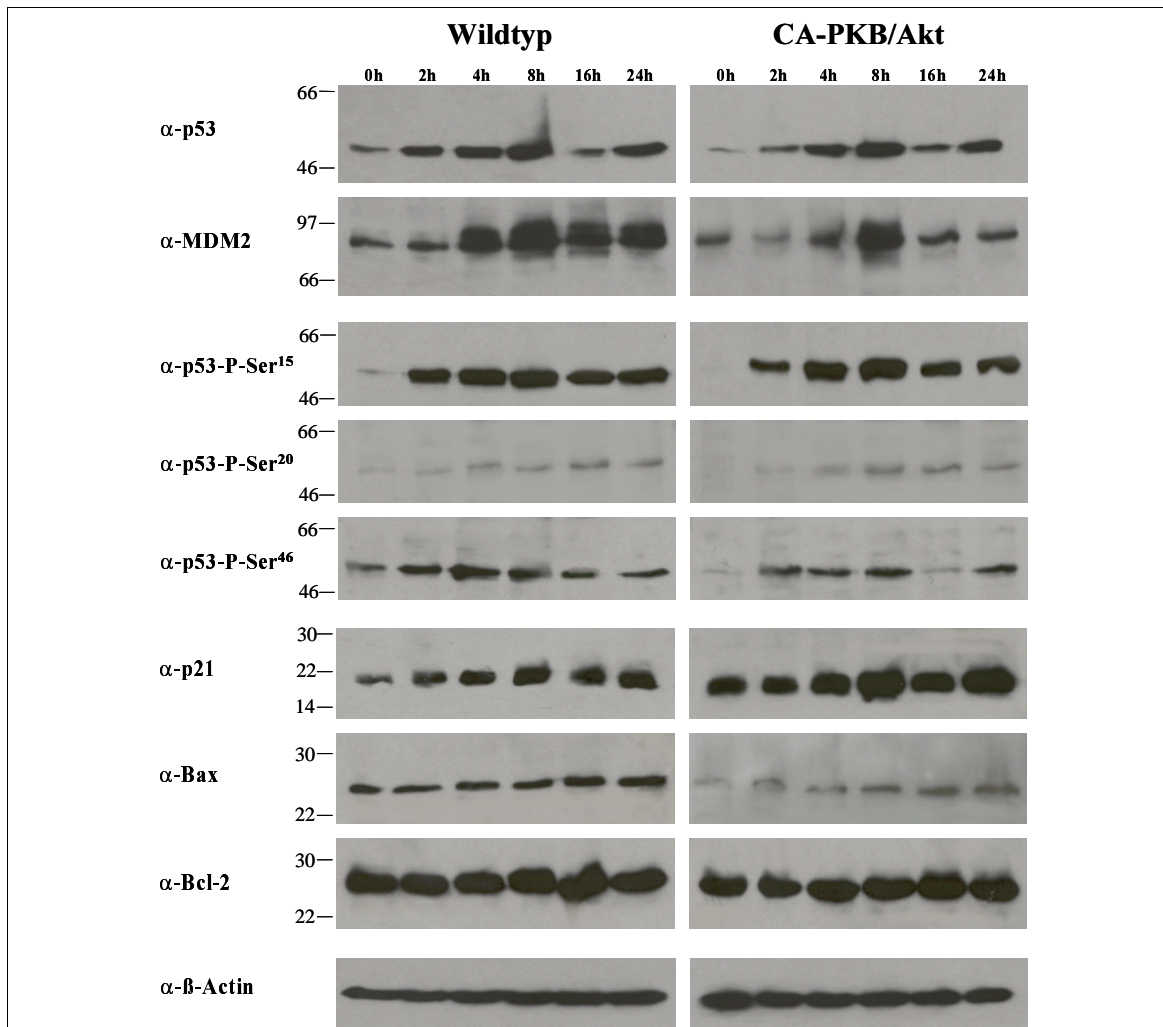
### **Molekulare Untersuchung der Induktion des p53 Signalwegs**

Nach dem Auftreten von DNA-Schäden beispielsweise durch Behandlung der Zellen mit Zytostatika wird ein dritter wichtiger apoptotischer Signalweg aktiviert, bei dem das Tumorsuppressorprotein p53 eine Schlüsselfunktion besitzt. Die Aktivierung von p53 erfolgt mittels Phosphorylierung an mehreren Serin-Resten durch verschiedene Serin-/Threonin-Kinasen wie ATM, ATR, DNA-PK oder Chk2 und führt zur Translokation von p53 in den Zellkern. Dort kann phosphoryliertes p53 die Transkription verschiedener Gene induzieren: Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup> reguliert die transkriptionelle Aktivität von p53 durch Induktion der Expression von MDM2, Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup> und Ser<sup>20</sup> führt zur Induktion der Expression von p21 und PCNA und somit zu Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, während Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>20</sup> und Ser<sup>46</sup> u.a. durch transkriptionelle Repression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und die Induktion der pro-apoptotischen Proteine Bax und AIP das Auftreten von Apoptose und die Initiation einer Caspase-Kaskade vermittelt (siehe Abb. 1-9) [97-109]. Da es Hinweise darauf gibt, dass PKB/Akt das Auftreten von p53-induzierter Apoptose verzögern kann [182], sollten Mitoxantron- und Cis Platin-behandelte kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zelllinien hinsichtlich der Induktion von p53 und MDM2, des Phosphorylierungsstatus von p53 sowie der p53-induzierten Transkription von p21 und Bax untersucht werden (Abb. 4-24).

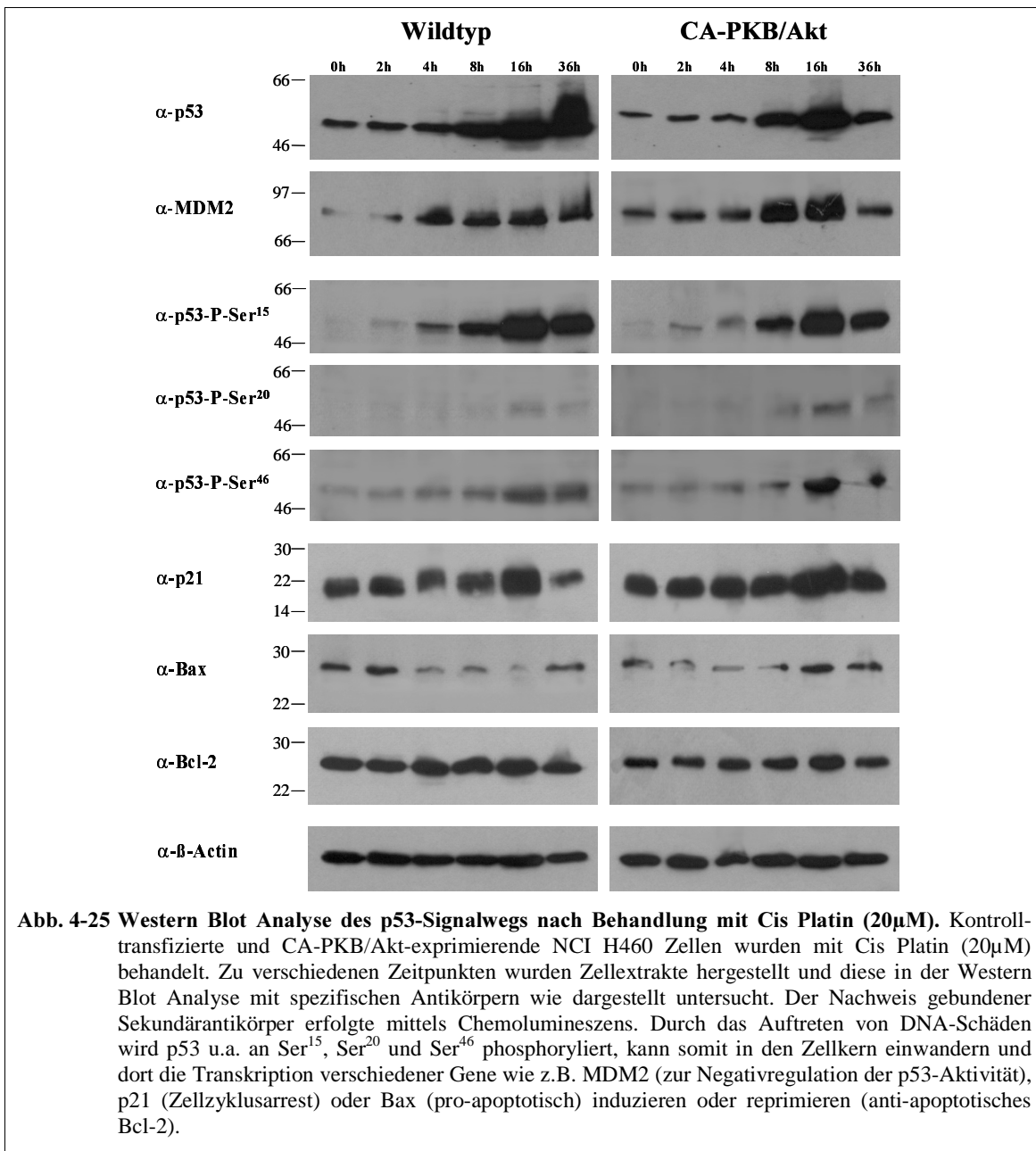
In CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen war nach Zugabe von 400nM Mitoxantron eine deutlich verlangsamte Hochregulation von p53 im Vergleich zu Kontrollzellen zu beobachten. Die Phosphorylierung von p53 an den Resten Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>20</sup> und Ser<sup>46</sup> trat in beiden Zelllinien 2h nach Zugabe von Mitoxantron auf.

Phosphoryliertes p53 kann als Transkriptionsfaktor in den Kern wandern und die Expression verschiedener Proteine initiieren. So induziert an Ser<sup>15</sup> phosphoryliertes p53 die Expression von MDM2, einem Protein, das durch Bindung an p53 dessen transkriptionelle Aktivität inhibiert. Durch die zeitverzögerte Induktion von p53 wird die Expression von MDM2 in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich verlangsamt hochreguliert. Die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 und des pro-apoptotischen Proteins Bax werden ebenfalls durch phosphoryliertes p53 initiiert, wobei die basale Expression von p21 in unbehandelten CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen bereits höher war als in unbehandelten Kontrollzellen. Auch nach Induktion der p21-Expression durch p53 wiesen CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen zu gleichen Zeitpunkten eine größere p21-

Proteinmenge auf als die Kontrollzellen. Im Fall der Expression von Bax war dies umgekehrt. Hier war die basale Expression in Kontrollzellen höher als in den CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen. Obwohl in beiden Zelllinien eine Induktion der Bax-Expression beobachtet werden konnte, war die Bax-Gesamtproteinmenge in den CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen deutlich niedriger als in den Kontrollzellen. Die Expression von antiapoptotischem Bcl-2, die durch phosphoryliertes p53 reprimiert wird, war in beiden Zelllinien gleich hoch und durch die p53-Induktion unbeeinflusst.



**Abb. 4-24 Western Blot Analyse des p53-Signalwegs nach Behandlung mit Mitoxantron (400nM).** Kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zellen wurden mit Mitoxantron (400nM) behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte hergestellt und diese in der Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern wie dargestellt untersucht. Der Nachweis gebundener Sekundärantikörper erfolgte mittels Chemolumineszenz. Durch das Auftreten von DNA-Schäden wird p53 u.a. an Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>20</sup> und Ser<sup>46</sup> phosphoryliert, kann somit in den Zellkern einwandern und dort die Transkription verschiedener Gene wie z.B. MDM2 (zur Negativregulation der p53-Aktivität), p21 (Zellzyklusarrest) oder Bax (pro-apoptotisch) induzieren oder reprimieren (anti-apoptotisches Bcl-2).



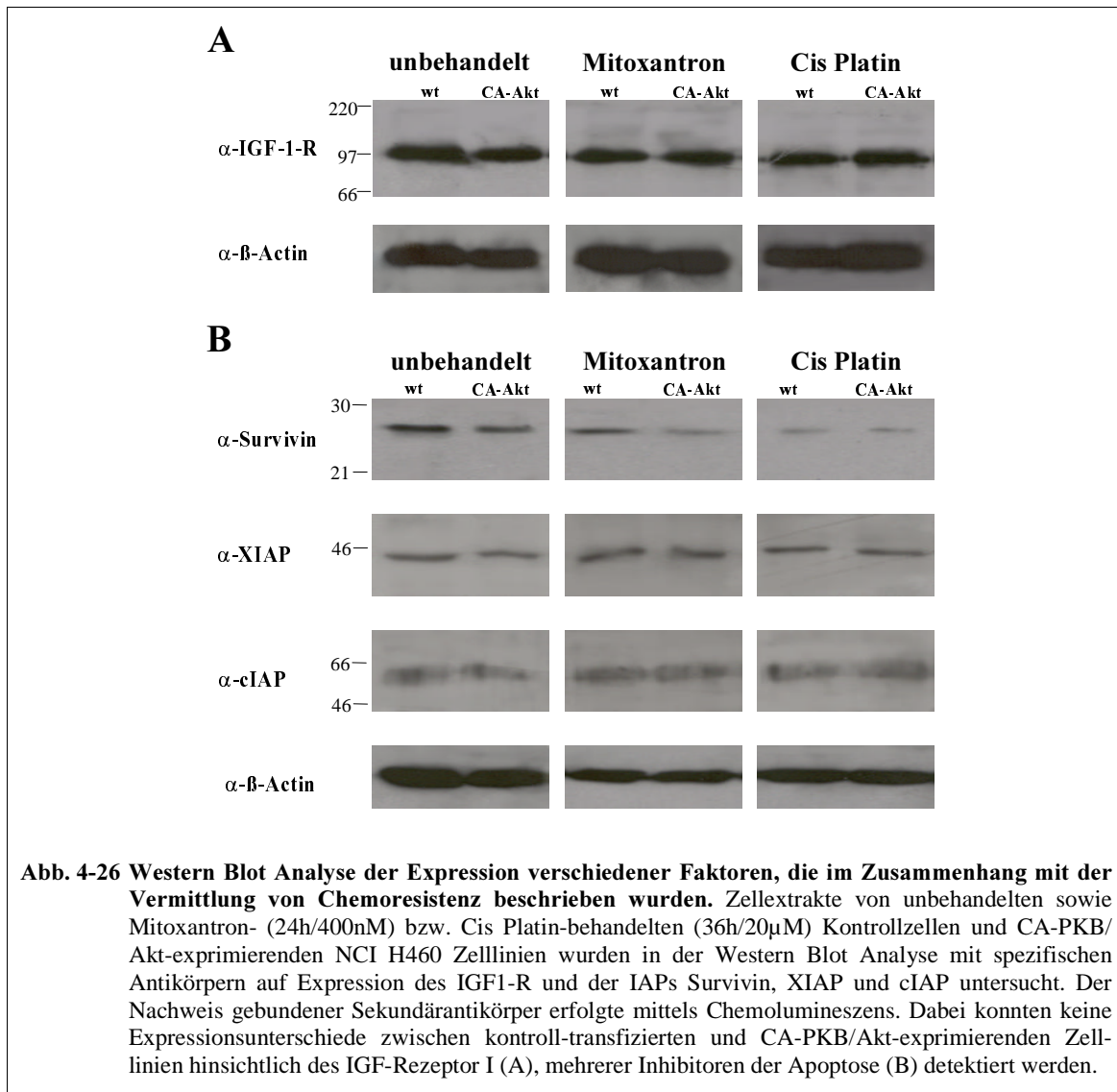
Wie bereits in Mitoxantron-behandelten Zellen zeigten Cis Platin-behandelte CA-PKB/Akt-exprimierende Zelllinien im Vergleich zu Kontrollzellen eine zeitliche Verschiebung der p53- und somit auch der MDM2-Induktion (Abb. 4-25). Besonders auffällig war jedoch, dass in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen nach 36-stündiger Inkubation mit Cis Platin die Proteinmenge sowohl von p53 als auch von MDM2 deutlich absank, während Kontrollzellen eine unvermindert starke Expression von p53 und MDM2 aufwiesen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass MDM2 von PKB/Akt phosphoryliert werden kann, phosphoryliertes MDM2 in den Zellkern transloziert und die transkriptionelle Aktivität von p53 inhibiert [146].

Die Phosphorylierung von p53 an Ser<sup>15</sup>, die alleine zur transkriptionellen Aktivierung der MDM2-Expression ausreichend ist, trat in beiden Zelllinien nach 4-stündiger Behandlung auf. Die Phosphorylierung an Ser<sup>20</sup>, die gemeinsam mit der Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup> für die Bindung an den p21-Promotor und somit für Wachstumsarrest sorgt, erfolgte erst nach 16-stündiger Inkubation. Die Phosphorylierung an Ser<sup>46</sup>, die gemeinsam mit der Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup> und Ser<sup>20</sup> die Transkription des pro-apoptotischen Proteins AIP und die Repression der Transkription des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 vermittelt, war basal detektierbar und stieg etwa 8h nach Zugabe von Cis Platin nochmals an. Wie bereits bei Behandlung der Zelllinien mit Mitoxantron war die basale Expression von p21 in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen größer als in Kontrollzellen. Eine Induktion der p21-Expression konnte aufgrund der im Vergleich zur Mitoxantron-Behandlung späteren p53-Induktion erst nach 16h nachgewiesen werden. Auch für die Expression von Bax zeigte sich erst nach 16h ein schwacher Anstieg. Die Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 blieb in beiden Zelllinien zunächst unbeeinflusst, nach einer Inkubationszeit von 36h zeigte sich in beiden Zelllinien jedoch eine Verringerung der Expression, was aufgrund des p53-Phosphorylierungsmusters auch zu erwarten war. Insgesamt trat die p53-Induktion nach Behandlung mit Cis Platin in beiden Zelllinien deutlich später auf als nach Inkubation mit Mitoxantron, wobei auch hier eine zeitliche Verschiebung der p53 Induktion in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu beobachten war.

### **Molekulare Untersuchung weiterer Mechanismen, die zur Desensitivierung gegenüber Zytostatika führen**

Neben verschiedenen Eingriffen in die drei bereits oben besprochenen Hauptwege zur Auslösung von Apoptose, wurden weitere Mechanismen entdeckt, die Zellen resistent gegenüber Chemotherapeutika machen. Dazu gehören verschiedene genetische und epigenetische Faktoren wie z.B. die verstärkte Expression von „Multi-Drug Resistance-“ (MDR-) Proteinen, die Modulation der Wirksamkeit von Zytostatika durch Wechselwirkungen mit der Mikroumgebung des Tumors oder die Amplifikation bestimmter anti-apoptotisch wirksamer Gene [183]. Daher sollte nun die Expression verschiedener Faktoren überprüft werden, die in der Literatur im Zusammenhang mit Vermittlung von Chemoresistenz beschrieben wurden. Der IGF1-Rezeptor kann nach seiner Aktivierung durch Bindung des Liganden, Homodimerisierung und anschließende Autophosphorylierung die Aktivität verschiedener Signalwege modulieren, wobei neben proliferativen auch anti-apoptotische Signale vermittelt werden [172]. Die Modulation der Rezeptorexpression kann daher das Ansprechen von Zellen auf Zytostatika beeinflussen. Unter allen hier getesteten

Bedingungen war die zelluläre Expression des IGF1-R aber in kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien gleich (Abb. 4-26A). Die Chemoresistenz von CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen scheint daher nicht durch eine Veränderung der Expression des IGF1-R hervorgerufen zu werden. Eine Verringerung der Expression von funktionalem Rezeptor an der Zelloberfläche oder die Modifikation des Rezeptors beispielsweise durch Phosphorylierung konnten in diesen Expressionsversuchen allerdings nicht überprüft werden und müssten in weiteren Experimenten untersucht werden.



Auch der Familie der Inhibitoren der Apoptose (IAPs) wird eine zentrale Rolle in der Unterdrückung apoptotischer Mechanismen zugeschrieben [184]. IAPs (Survivin, XIAP, cIAP) können direkt mit Pro-Caspasen wechselwirken und so die proteolytische Spaltung zur aktiven Caspase verhindern. Die Bedeutung von IAPs wird dadurch verdeutlicht, dass Survivin in einer Vielzahl von chemoresistenten Tumoren überexprimiert wird [184]. Bei der

Untersuchung zellulärer Extrakte aus unbehandelten sowie Mitoxantron- (24h/400nM) bzw. Cis Platin-behandelten (36h/20 $\mu$ M) Kontrollzellen und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien zeigten sich jedoch keinerlei Expressionsunterschiede für die IAPs Survivin, XIAP und cIAP (Abb. 4-26B). IAPs spielen also scheinbar bei der PKB/Akt-vermittelten Chemoresistenz nur eine untergeordnete Rolle. Auch hier müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um eventuell vorhandene Modifikationen der IAPs (wie beispielsweise Phosphorylierung) nachzuweisen, die einen Einfluss auf die Aktivität der IAPs besitzen könnten.

### **Rolle von PKB/Akt bei der Vermittlung von Chemoresistenz**

Aus den Ergebnissen des Kapitels 4.2.4. lässt sich ableiten, dass PKB/Akt Chemoresistenz über verschiedene Mechanismen zu vermitteln scheint. Bei der Untersuchung verschiedener Signalwege, die an der Auslösung von Apoptose beteiligt sind, konnten deutliche Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen und Kontrollzellen detektiert werden. In den Untersuchungen zur Aktivierung von Caspasen zeigte sich, dass Cis Platin behandelte Kontrollzellen eine starke Aktivierung der beiden Schlüssel-Caspasen 8 und 9, der Effektor-Caspasen 3 und 7 sowie des Caspase-Substrates PARP aufwiesen, während sich in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen nur eine wesentlich schwächere Aktivierung der Schlüssel-Caspasen 8 und 9 sowie der Effektor-Caspase 7, aber keine Aktivierung von Caspase 3 und Spaltung von PARP zeigte. Auch Mitoxantron behandelte Zellen wiesen - in etwas schwächerem Maße - ebenfalls eine differenzielle Aktivierung von Caspasen, insbesondere der Caspasen 9 und 3, auf. Bei detaillierter Betrachtung des Todesrezeptor- und des mitochondrialen Signalwegs zur Auslösung von Apoptose zeigten sich für mehrere Faktoren der mitochondrialen Signalkaskade deutliche Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen. So war insbesondere unter Hungerbedingungen die Initiator-Caspase 9 in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen stärker phosphoryliert als in Kontrollzellen. Nach seiner Phosphorylierung an Ser<sup>196</sup> kann Pro-Caspase 9 nicht mehr proteolytisch gespalten werden, wodurch sich möglicherweise die Unterschiede in der Aktivierung von Caspase 9 in CA-PKB/Akt-exprimierenden und kontroll-transfizierten Zellen erklären lassen [171]. Ein weiteres anti-apoptotisches Signal könnte die verstärkte Expression von Bcl-x<sub>L</sub> in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen darstellen, was die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien erschweren und so ebenfalls die Aktivierung von Pro-Caspase 9 verhindern könnte [83]. Bei Betrachtung des p53-Signalwegs, der in Zellen nach dem Auftreten von DNA-Schäden aktiviert wird, ließen sich wiederum Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen und Kontrollzellen detektieren. So zeigten

CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen sowohl nach Behandlung mit Mitoxantron als auch mit Cis Platin eine deutlich verlangsamte Hochregulation von p53 im Vergleich zu Kontrollzellen. Wie bereits in der Literatur beschrieben, scheint PKB/Akt das Auftreten von p53-induzierter Apoptose verzögern zu können [182]. Darüber hinaus fiel bei der Behandlung der Zellen mit Cis Platin auf, dass in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen nach 36-stündiger Inkubation die Proteinmenge sowohl von p53 als auch von MDM2 deutlich absank, während Kontrollzellen eine unvermindert starke Expression von p53 und MDM2 aufwiesen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass MDM2 von PKB/Akt phosphoryliert wird, phosphoryliertes MDM2 in den Zellkern transloziert und die transkriptionelle Aktivität von p53 inhibieren kann [146].

#### 4.2.5. Etablierung eines *in vivo*-Tumormodells

Die Ergebnisse aus den *in vitro*-Versuchen haben gezeigt, dass PKB/Akt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Chemoresistenz spielt. Daher sollte nun überprüft werden, ob es sich bei der Vermittlung von Chemoresistenz durch PKB/Akt um reine Zellkulturphänomene handelt oder ob sich diese Effekte auch in humanen Tumoren reproduzieren lassen. Exemplarisch wurde daher ein Xenograft Modell mit humanen CA-PKB/Akt-exprimierenden bzw. kontroll-transfizierten NCI H460 Zelllinien in Nacktmäusen etabliert. NCI H460 Zellen exprimieren sowohl Wildtyp Retinoblastomprotein als auch Wildtyp p53, reagieren, wie in dieser Arbeit gezeigt, sehr sensitiv auf Behandlung mit einer Vielzahl von Chemotherapeutika und bilden nach subkutaner Injektion an Nacktmäusen solide Tumore.

CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zelllinien zeigten in den Proliferationsversuchen im Vergleich zu Kontrollzellen eine geringere Wachstumsrate. Um zu gewährleisten, dass die Tiere zu Beginn der Therapie vergleichbar große Tumore von kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen aufwiesen, wurden zur Kompensation der langsameren Proliferation die doppelte Anzahl CA-PKB/Akt-exprimierender Zellen eingesetzt. Nu<sup>+</sup>/Nu<sup>-</sup> Nacktmausweibchen (Züchter: Mølugaard und Bornholtgard, Batch: 01/15 - geliefert am 23.01.01) wurden 1,5x10<sup>6</sup> kontroll-transfizierte NCI H460 Zellen in die rechte Flanke sowie 3x10<sup>6</sup> CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zellen in die linke Flanke subkutan injiziert. Nach Anwachsen der Tumore auf ein Volumen von ca. 0,2ml wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen mit der Therapie der einzelnen Gruppen begonnen. Zur Therapie wurden den Tumor-tragenden Mäusen sowohl Zellzyklus-spezifische Zytostatika (Taxol - 14x 12,5, 25 und 50mg/kg, 5-FU - 14x 7,5, 15 und 30mg/kg) als auch Zellzyklus-unspezifische Chemotherapeutika (Cis Platin - 4x 0,625, 1,25 und 2,5mg/kg, Mitoxantron - 4x 1, 2 und 4mg/kg, Cyclophosphamid - 4x 50, 100 und 150mg/kg, Doxorubicin - 4x 1, 2 und 4mg/kg) in

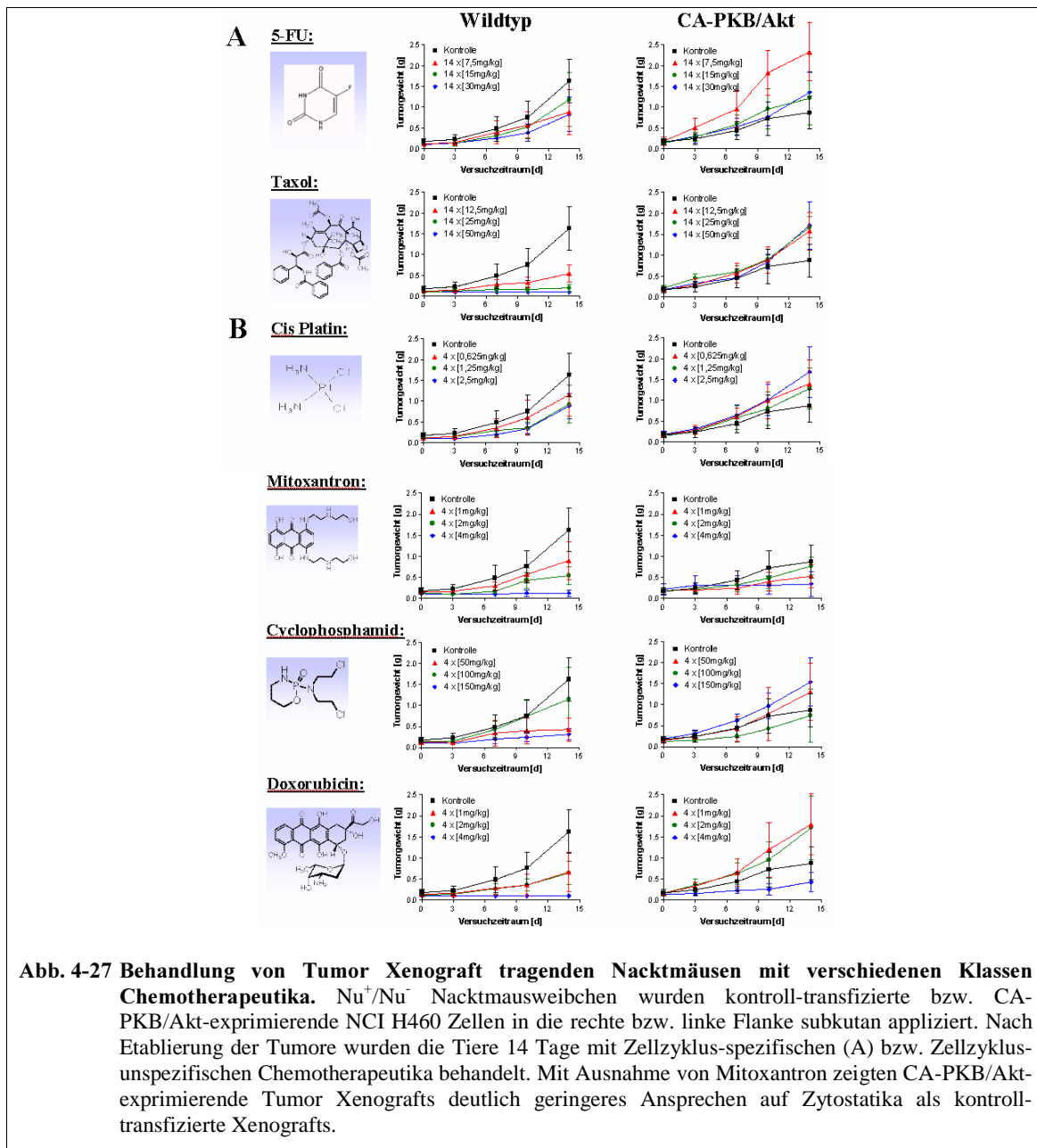


jeweils drei verschiedenen Konzentrationen täglich bzw. an den Tagen 0, 3, 7 und 10 i.p. appliziert. Die Wirkung von Zellzyklus-abhängigen Zytostatika zeigt sich dabei nur, wenn Zellen sich teilen und den Zellzyklus durchlaufen: Der Antimetabolit 5-FU wirkt in der S-Phase und hemmt die DNA- sowie die RNA-Synthese, während Zellen nach Behandlung mit Taxol nicht in der Lage sind, die Mitose vollständig zu durchlaufen. Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika hingegen können ihre Wirkung ohne das Durchlaufen des Zellzyklus entfalten. Ihre Wirkung ist daher in weiten Teilen unabhängig von der Proliferation der Zellen [15]. Eine Versuchsgruppe umfasste für jede Substanz und jede Konzentrationsstufe jeweils 7 Tiere. Der Kontrollgruppe wurde 14x eine physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) appliziert. Das Tumolvolumen aller Tiere wurde zu Beginn der Behandlung und anschließend nach 3, 7, 10 und 14 Tagen durch Ertasten der Tumore und Vergleich mit einem Volumenstandard bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-27 dargestellt.

Bei Behandlung der Tiere mit dem Zellzyklus-spezifischen Antimetaboliten 5-FU war im kontroll-transfizierten Tumor im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bei allen Konzentrationen vermindertes Tumorwachstum zu beobachten, während die CA-PKB/Akt-Tumore trotz Behandlung sogar stärker wuchsen als unbehandelte CA-PKB/Akt-Kontrolltumore. Ein ähnliches Bild ergab sich für die Behandlung mit Taxol. Durch Applikation der beiden höchsten Konzentrationsstufen konnte das Tumorwachstum der kontroll-transfizierten Xenografts nahezu vollständig gehemmt werden. CA-PKB/Akt-exprimierende Tumore wuchsen unter Behandlung unbeeinflusst weiter, wobei auch hier das Wachstum stärker war als in PBS-behandelten CA-PKB/Akt-Kontrolltumoren (Abb. 4-27A).

Auch gegenüber Zellzyklus-unabhängigen Substanzen ließ sich eine PKB/Akt-vermittelte *in vivo*-Desensitivierung beobachten. So zeigte sich bei Behandlung kontroll-transfizierter Tumore mit Cis Platin eine Dosis-abhängige Verminderung des Tumorwachstums, während CA-PKB/Akt-Tumore trotz Cis Platin-Behandlung ein im Vergleich zum unbehandelten Kontrolltumor stärkeres Wachstum aufwiesen. Nach Applikation von Cyclophosphamid bzw. Doxorubicin wuchsen die kontroll-transfizierten Xenografts deutlich langsamer als unbehandelte kontroll-transfizierte Xenografts, wobei es durch Gabe der jeweils höchsten Konzentration zu einer vollständigen Wachstumshemmung des Tumors kam. Dieser therapeutische Effekt war in CA-PKB/Akt-exprimierenden Tumoren wiederum aufgehoben. Cyclophosphamid behandelte CA-PKB/Akt-Tumore wuchsen vergleichbar zum PBS-behandelten CA-PKB/Akt-exprimierenden Kontrolltumor, Doxorubicin zeigte nur in seiner höchsten Konzentration einen Einfluss auf das Wachstum der CA-PKB/Akt-Tumore. Einzig für Mitoxantron konnte im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten keine Desensitivierung

durch PKB/Akt beobachtet werden. Sowohl in untransfizierten Xenografts als auch CA-PKB/Akt-exprimierenden Xenografts kam es zu einer Dosis-abhängigen Verminderung des Tumorwachstums.



Insgesamt ließ sich in diesem Versuch außer für Mitoxantron *in vivo* eine PKB/Akt-vermittelte Desensitivierung gegenüber Standardtherapeutika darstellen. In den *in vitro*-Experimenten war dieser Effekt besonders stark bei Behandlung der Zellen mit Zellzyklus-unabhängigen Substanzen und weniger deutlich bei Applikation von Zellzyklus-abhängigen Substanzen ausgeprägt. Diese Differenzierung ließ sich in den *in vivo*-Versuchen dagegen nicht beobachten. Dieses Tiermodell stellt ein bedeutendes Instrument zur Validierung

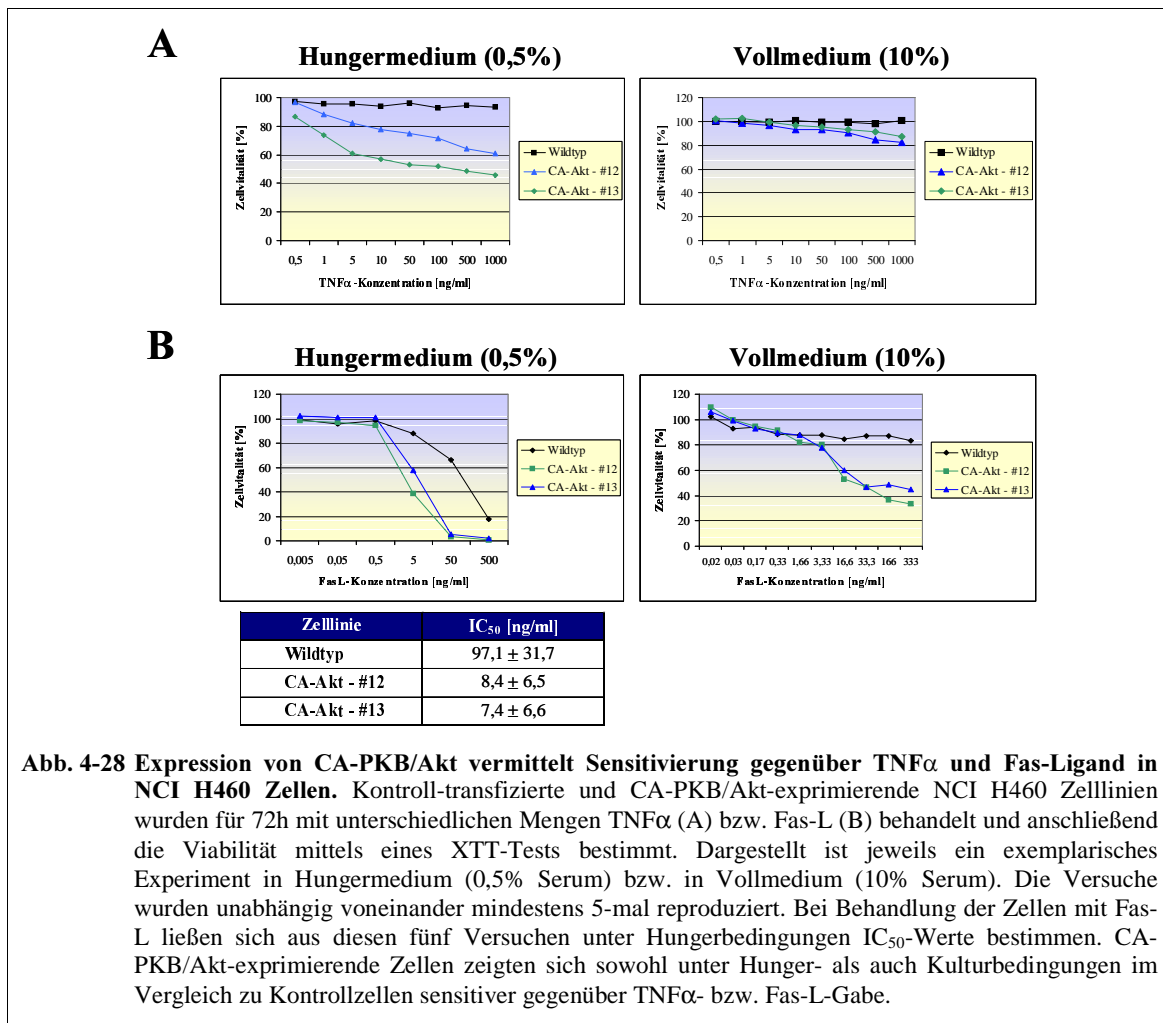
potentieller PKB/Akt-Inhibitoren aus der pharmazeutischen Wirkstoffsuche dar. Dabei sollte ein PKB/Akt-Inhibitor in der Lage sein, die PKB/Akt-vermittelte Chemoresistenz zu durchbrechen und CA-PKB/Akt-exprimierende Xenografts gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika so zu sensitivieren, dass CA-PKB/Akt-exprimierende Tumore das gleiche Ansprechverhalten auf Zytostatika aufweisen wie NCI H460 Kontrolltumore.

#### 4.2.6. Besitzt PKB/Akt eine pro-apoptotische Wirkung ?

In den vorangegangenen Experimenten konnte schlüssig gezeigt werden, dass PKB/Akt bei der Vermittlung von Chemoresistenz eine bedeutende Rolle spielt. In der Literatur wurde darüber hinaus beschrieben, dass konstitutiv-aktives PKB/Akt auch Fas-L- und TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose in murinen Hepatozyten durch die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B unterdrücken kann [185]. Analog zu den Versuchen mit Zytostatika wurden daher kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zelllinien für 72h mit unterschiedlichen Mengen rekombinantem TNF $\alpha$  bzw. Fas-L behandelt. Statt der erwarteten Desensitivierung gegenüber der Behandlung mit den beiden rekombinanten pro-apoptotischen Zytokinen TNF $\alpha$  und Fas-L wurde im Gegenteil sogar eine Sensitivierung von CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet, die sich in fünf voneinander unabhängigen Experimenten reproduzieren ließ (Abb. 4-28).

Während NCI H460 Kontrollzellen weder unter Hunger- noch unter Kulturbedingungen sensitiv gegenüber der Behandlung mit TNF $\alpha$  waren, wiesen CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen sowohl unter Hunger- als auch unter Kulturbedingungen eine deutliche Beeinflussung der Proliferation bei Zugabe hoher TNF $\alpha$ -Konzentrationen auf (Abb. 4-28A). Dieser Effekt war unter Kulturbedingungen allerdings deutlich schwächer ausgeprägt, was im Einklang mit der Literatur steht, da Zellen, die in Kulturmedium gute Wachstumsbedingungen vorfinden und somit in vollem Umfang Proteinbiosynthese betreiben, allgemein weniger sensitiv gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose sind [178].

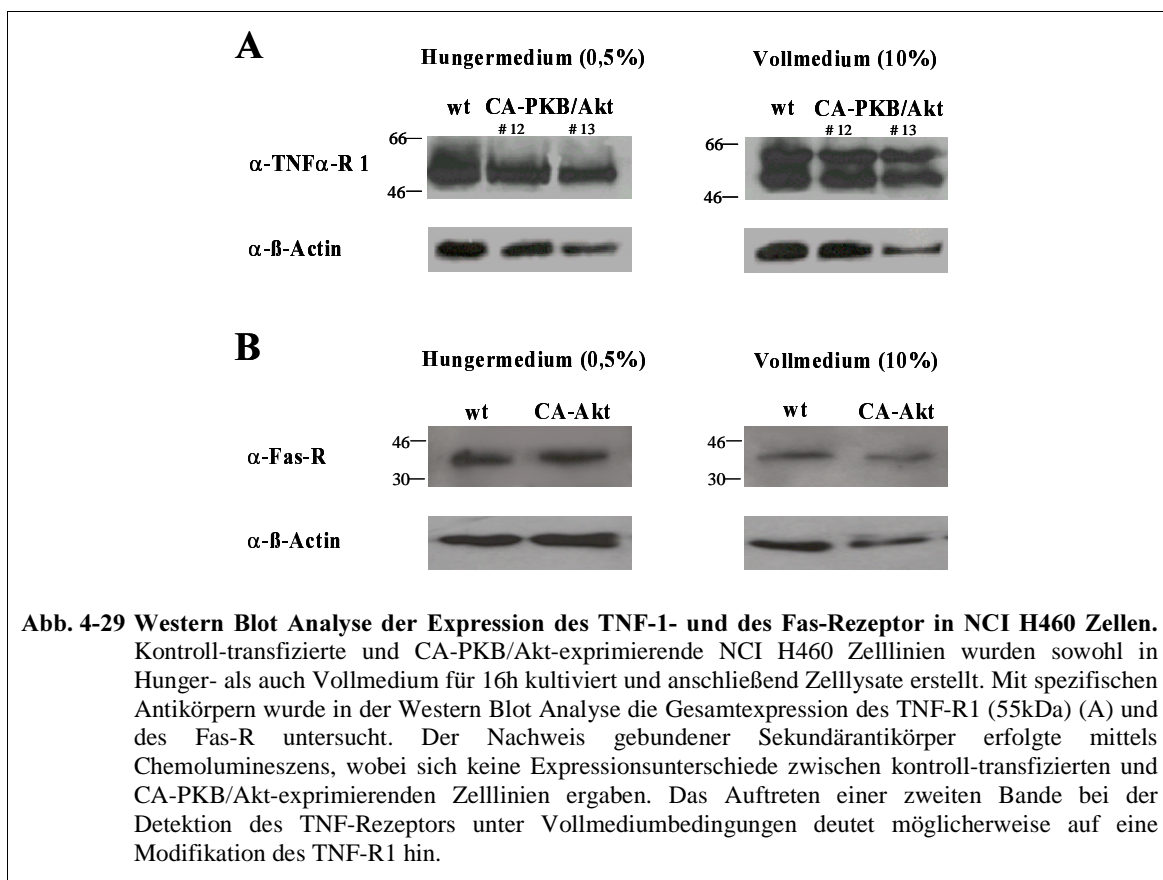
Auch bei Behandlung der Zellen mit rekombinantem Fas-L zeigten sich CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen sowohl unter Hunger- als auch unter Kulturbedingungen im Vergleich zu Kontrollzellen stärker sensitiv (Abb. 4-28B), wobei das Ergebnis wiederum in fünf unabhängigen Versuchen reproduziert werden konnte. Unter Hungerbedingungen ließen sich IC<sub>50</sub>-Werte aus den Dosis-Wirkungskurven bestimmen. Die IC<sub>50</sub> für Kontrollzellen war gegenüber CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien um den Faktor 12 auf 97,1 ng/ml verschoben.



**Abb. 4-28 Expression von CA-PKB/Akt vermittelt Sensitivierung gegenüber TNF $\alpha$  und Fas-Ligand in NCI H460 Zellen.** Kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zelllinien wurden für 72h mit unterschiedlichen Mengen TNF $\alpha$  (A) bzw. Fas-L (B) behandelt und anschließend die Viabilität mittels eines XTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Experiment in Hungermedium (0,5% Serum) bzw. in Vollmedium (10% Serum). Die Versuche wurden unabhängig voneinander mindestens 5-mal reproduziert. Bei Behandlung der Zellen mit Fas-L ließen sich aus diesen fünf Versuchen unter Hungerbedingungen IC<sub>50</sub>-Werte bestimmen. CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen zeigten sich sowohl unter Hunger- als auch Kulturbedingungen im Vergleich zu Kontrollzellen sensitiver gegenüber TNF $\alpha$ - bzw. Fas-L-Gabe.

Zur genaueren Untersuchung dieser Beobachtung wurden Zelllysate von kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen auf die Gesamtexpression des TNF-Rezeptors 1 und des Fas-Rezeptors analysiert. Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und die zugehörige Rezeptorfamilie sind insbesondere bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems bedeutsam. TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) ist ein Typ 1 Membranprotein und koppelt an zwei Signalwege (siehe Abb. 1-6) [66]. Zum einen wird bei Rezeptor-Stimulation der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert, der nach Translokation in den Zellkern die Transkription anti-apoptotischer Gene initiiert. Zum anderen wird durch Bildung des DISC und anschließender Aktivierung von Caspase 8 Apoptose induziert [77]. Der Fas-Rezeptor und Fas-Ligand sind bedeutsam für die Homöostase des Immunsystems und für die Erhaltung der peripheren Immuntoleranz [72]. Fas-R rekrutiert nach seiner Aktivierung und Trimerisierung das Adaptorprotein FADD und Pro-Caspase 8 zur Formation des DISC (siehe Abb. 1-5). Im Gegensatz zum TNF-R koppelt Fas-R allerdings nicht an den NF- $\kappa$ B-Signalweg [66].

In der Western Blot Analyse zeigte sich unter Hungerbedingungen in kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen eine Bande bei der erwarteten Größe von etwa 55kDa, die auf eine gleichmäßige Expression von TNF-R1 in den einzelnen Zelllinien hindeutet (Abb. 4-29A). Unter Kulturbedingungen trat in der Western Blot Analyse neben der Bande bei etwa 55kDa noch eine Bande bei etwa 60kDa auf, die in allen Zelllinien vergleichbar stark ausgeprägt ist. Hierbei handelt es sich nicht um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit TNF-R2, da dieser eine Bande von etwa 75kDa ergeben sollte [77]. Möglicherweise handelt es sich um Modifikationen am TNF-R1 oder um die Expression einer zusätzlichen Splice-Variante des TNF-R1. Bei Betrachtung der Gesamtexpression des Fas-R zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen (Abb. 4-29B).



Die Aktivierung von Caspase 8 nach Zugabe von TNF $\alpha$  bzw. Fas-L trat verstärkt in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen auf. Insbesondere bei Behandlung der Zellen mit 10ng/ml TNF $\alpha$  zeigten CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460 Zellen nach 16h eine deutliche Aktivierung von Caspase 8, die in Kontrollzellen nicht zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Dagegen ergaben sich keine Unterschiede zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen bei Betrachtung der Phosphorylierung und Degradation von

I $\kappa$ B als Maß der Aktivierung von NF- $\kappa$ B. In beiden Zelllinien war bereits 5min nach Zugabe von TNF $\alpha$  eine starke Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Auch bei der weiteren Analyse der Todesrezeptor-Signalwege zeigten sich zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zelllinien nach Behandlung der Zellen mit Fas-L bzw. TNF $\alpha$  keine Unterschiede im Expressionsprofil der Adaptermoleküle TRADD, FADD und RIP sowie der Caspase 8 Inhibitoren c-FLIP  $\alpha$  und  $\beta$  (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnten auf Expressionsebene keine Unterschiede zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zelllinien detektiert werden, die das unterschiedliche Ansprechen auf TNF $\alpha$  und Fas-L erklären könnten.

Die Sensitivierung CA-PKB/Akt-exprimierender Zellen gegenüber der Behandlung mit Fas-Ligand und TNF $\alpha$  ließ sich außer in NCI H460 in keiner anderen Zelllinie zeigen. MCF10A und SK-OV-3 Zelllinien wiesen keine Sensitivität gegenüber den beiden pro-apoptotischen Zytokinen auf. Beide Zelllinien exprimieren kein intaktes p53-Protein. Laut Literatur ist die Expression von Wildtyp p53 aber Voraussetzung für Fas-Ligand- bzw. TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose [99]. A-549 Zellen, deren p53-Status Wildtyp ist, zeigten sich sensitiv gegenüber Behandlung mit TNF $\alpha$  und Fas-L. Allerdings ließ sich keine definitive Aussage über die Modifikation der Sensitivität gegenüber diesen apoptotischen Stimuli durch die Expression von CA-PKB/Akt treffen, da die klonale Varianz zu groß war. Eine pro-apoptotische Funktion von PKB/Akt konnte also nur für NCI H460 Zellen gezeigt werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass sich in NCI H460 Zellen eine deutliche Sensitivierung gegenüber beiden Zytokinen und nicht nur gegenüber Fas-L oder TNF $\alpha$  detektieren ließ und dass diese Ergebnisse in 5 unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnten.

Genauere Hinweise auf den molekularen Ursprung der Sensitivierung von CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen gegenüber den beiden apoptotischen Zytokinen könnten sich möglicherweise bei der Analyse eventuell vorhandener Modifikationen verschiedener Adaptermoleküle oder der Oberflächenexpression der Todesrezeptoren ergeben. Auch die eingehendere Betrachtung der potentiellen Modifikation des TNF-Rezeptors würde einen weiteren Ansatzpunkt bieten. Ebenso könnten Versuche mit anderen Zytokinen wie beispielsweise TRAIL tieferegreifende Erkenntnisse bringen. Darüber hinaus müssten weitere Wildtyp p53-exprimierende Zelllinien mit CA-PKB/Akt transfiziert und analysiert werden, um eine Aussage treffen zu können, ob es sich um eine allgemein gültige Beobachtung oder ein NCI H460 charakteristisches Phänomen handelt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf-Interaktion

Der erste Teil dieser Promotionsarbeit befasste sich mit der Etablierung eines Testsystems, mit Hilfe dessen Substanzen detektiert werden können, die selektiv die Interaktion von Ras und Raf, zweier Schlüsselproteine der mitogenen Signalkaskade, inhibieren. In einer Vielzahl maligner Transformationen spielt die Deregulation dieser Signalkaskade eine bedeutende Rolle. Daher besteht in der pharmazeutischen Forschung ein großes Interesse daran, spezifische Inhibitoren zu finden, die in der Lage sind, solche proliferative Signale zu unterbinden und möglicherweise Ras-vermittelte Malignität einzudämmen.

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurden bislang eine Reihe verschiedener Methoden wie zum Beispiel das Yeast two-hybrid System entwickelt. Ein solches zelluläres Detektionssystem weist bei seiner Verwendung als Testsystem zur Wirkstofffindung einige Nachteile auf: Die zu testende Substanz muss zum einen durch die Zellmembran der Hefe diffundieren. Des Weiteren können Substanzen, die Apoptose induzieren bzw. die Zellteilung inhibieren, nicht oder nur sehr schlecht untersucht werden. Schließlich finden in diesem Hefesystem alle Protein-Protein-Interaktionen im Kern statt, weswegen beispielsweise Interaktionen transmembraner Proteine nur sehr eingeschränkt untersucht werden können.

Eine neue Methode zur direkten Detektion von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* und *in vivo* wurde mit der intracistronischen  $\beta$ -Galaktosidase Komplementation entwickelt [54]. Hierbei werden zwei sich nicht komplementierende Deletionsmutanten der  $\beta$ -Galaktosidase, deren Affinität zueinander sehr niedrig ist, mit interagierenden Proteinpaares fusioniert. Durch die Interaktion des Proteinpaares kommt es zur Ausbildung eines aktiven Enzymkomplexes, dessen Aktivität sich über die Umwandlung eines fluorogenen Substrats nachweisen lässt [62-64]. Da die Handhabung dieses Testsystems relativ einfach ist, besteht die Möglichkeit einer Hochdurchsatzanalyse von Substanzbanken zur Auffindung spezifischer Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen [54]. Aufgrund seiner Vorzüge gegenüber anderen Systemen zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Komplementation zur Etablierung eines *in vitro* Testsystems zur Auffindung von Inhibitoren der Ras-Raf-Proteininteraktion ausgewählt.

Bei Expression von Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase sowie der Deletionsmutanten  $\Delta\alpha$ ,  $\Delta\omega$  und  $\Delta\mu$  in rekombinanten *Pichia Pastoris* Stämmen zeigte sich, dass trotz Optimierung der Aufschluss-

und Selektionsbedingungen *in vitro* nur eine sehr geringe Enzymaktivität bzw. keine Komplementation potentiell interagierender Deletionsmutanten detektiert werden konnte. Dies war wahrscheinlich auf die relativ geringe Expressionsrate der rekombinanten *Pichia Pastoris* Stämme zurückzuführen. Möglicherweise verhinderten zudem endogene *Pichia Pastoris* Proteine aus dem Zellaufschluss die *in vitro*-Komplementation der Deletionsmutanten.

Bei bakterieller Expression von Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase, der Deletionsmutanten  $\Delta\alpha$ ,  $\Delta\omega$  und  $\Delta\mu$  sowie der Ras-/Raf- bzw. Activin-1B-R-/FKBP12-Fusionsproteine wurden im Stamm *E. coli* ER2507, der weder endogene  $\beta$ -Galactosidase noch deren Deletionsmutanten exprimiert, höhere Expressionsraten erzielt. Im Enzymaktivitätstest ließ sich ein deutlich höheres Messsignal mit Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase im Vergleich zur Expression in *Pichia Pastoris* detektieren, wobei sich die Aktivität der Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase über mehrere Verdünnungsstufen linear verhielt. In Komplementationsversuchen konnte jedoch wiederum keine *in vitro*-Komplementation von  $\Delta\alpha$  mit  $\Delta\omega$  bzw.  $\Delta\mu$  und von  $\Delta\omega$  mit  $\Delta\mu$  beobachtet werden. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass die Deletionsmutanten und Fusionsproteine aufgrund sterischer Restriktionen nicht funktionell exprimiert wurden, endogene bakterielle Proteine die Interaktion der Komplementationspartner in Zelllysaten verhinderten oder die Interaktion *in vitro* unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zu schwach war, um  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität zu detektieren.

Die Funktionalität aller Deletionsmutanten und Fusionsproteine innerhalb der Bakterienzellen konnte in verschiedenen Experimenten nachgewiesen werden. So zeigte sich, dass alle  $\Delta\omega$ -Deletionsmutanten und  $\Delta\omega$ -Fusionsproteine im Stamm *E. coli* XL1-Blue, der eine endogene  $\Delta\alpha$ -Deletionsmutante exprimiert, zu einem funktionalen  $\beta$ -Galactosidase-Komplex komplementiert werden konnten und somit funktionell exprimiert wurden. In Doppeltransformationsexperimenten verschiedener sich komplementierender Proteinpaare ließ sich ebenfalls eine *in vivo*-Komplementation nachweisen, wodurch die funktionelle Expression der einzelnen Deletionsmutanten und der Fusionsproteine dokumentiert werden konnte. Desweiteren ließ sich mit Hilfe der Substanz FK506, einem selektiven Inhibitor der Activin-1B-R/FKBP12-Interaktion, die Spezifität der Interaktion der Komplementationspartner  $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R und  $\Delta\omega$ -FKBP12 *in vivo* darlegen. Hierbei war jedoch auffällig, dass die Inhibition der Interaktion von Activin-1B-R und FKBP12 durch FK506 ausschließlich beobachtet werden konnte, wenn FK506 bereits zu Versuchsbeginn zeitgleich mit der Induktion der Expression von  $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R und  $\Delta\omega$ -FKBP12 und nicht zu einem späteren Zeitpunkt zugegeben wurde.



Dies erklärt sich wahrscheinlich durch die Ausbildung stabiler Fusionsprotein-Oligomere, deren Interaktion durch die nachträgliche Zugabe des Inhibitors nicht mehr zu verhindern war. Um auszuschließen, dass endogene bakterielle Proteine, die nach dem Zellaufschluss im Lysat vorliegen, die *in vitro*-Komplementation der Deletionsmutanten verhindern können, wurden sowohl Wildtyp  $\beta$ -Galactosidase und als auch die Fusionsproteine  $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R und  $\Delta\omega$ -FKBP12 unter nativen Bedingungen aufgereinigt und anschließend im Aktivitätstest auf  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität untersucht. Wiederum ließ sich jedoch keine *in vitro*-Komplementation detektieren. In nachfolgenden Experimenten mit aufgereinigten  $\Delta\alpha$ -Activin-1B-R- und  $\Delta\omega$ -FKBP12-Fusionsproteinen konnte mittels Co-Immünpräzipitation nachgewiesen werden, dass die beiden Proteine unter den gegebenen *in vitro* Versuchsbedingungen nur sehr schwach miteinander interagierten und sich daher kein aktiver Enzymkomplex aus beiden Fusionsproteinen bildete.

Eine erfolgreiche Komplementation von Deletionsmutanten und Fusionsproteinen zeigte sich also nur in intakten *E. coli* Zellen, nicht aber *in vitro*. Das Testsystem wurde daraufhin nicht weiterentwickelt, da ein zelluläres, *E. coli* basiertes Testsystem ähnliche Nachteile aufweist, wie sie sich im Yeast two-hybrid System zeigen. Ein potentieller Inhibitor der Ras-Raf-Interaktion müsste bei dem hier entwickelten Testsystem vor Induktion der Proteinexpression zugegeben werden, da es sonst zur Ausbildung zellulärer Proteinkomplexe in *E. coli* kommen könnte, die durch nachträgliche Zugabe einer potentiell inhibitorischen Substanz nicht mehr aufgelöst werden könnten. Die daraus resultierende lange Inkubationszeit von *E. coli* mit den zu untersuchenden, potentiell anti-proliferativen Substanzen könnte möglicherweise die Zellproliferation oder die induzierte Proteinexpression beeinflussen und somit ein eindeutiges Messergebnis verhindern. Zellfreie Bedingungen wären also bei der Wirkstoffsuche nach anti-proliferativ wirksamen Substanzen gegenüber einem zellulären System deutlich bevorzugt.

Das Haupthindernis bei der Etablierung eines reinen *in vitro* Testsystems mit rekombinanten Proteinen lag in der sehr schwachen Interaktion der Komplementationspartner. Diese ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die optimale dreidimensionale Struktur sowohl der Deletionsmutanten als auch der Fusionsproteine bei Expression in *E. coli* nicht erreicht wurde. Zum anderen wäre es denkbar, dass sich die Konformation von Ras und/oder Raf bzw. Activin-1B-R und/oder FKBP12 durch die Fusion mit den  $\beta$ -Galactosidase Deletionsmutanten so stark verändert hat, dass die Affinitäten der Interaktionspartner zueinander *in vitro* nur noch sehr gering sind. Eine Interaktion der Komplementationspartner kann somit nur unter den innerhalb der prokaryontischen Zellen gegebenen Bedingungen mit hoher Proteinexpression und eventuell unter Mithilfe zellulärer Proteine erfolgen.

Insgesamt zeigte sich, dass Protein-Protein-Interaktionssysteme wie die intracistronische  $\beta$ -Galactosidase Komplementation für jedes Proteinpaar neu etabliert und evaluiert werden müssen und nicht generalisiert betrachtet werden dürfen. Dies hat zur Folge, dass sich Aussagen über die Funktionalität und Anwendbarkeit eines solchen Testsystems erst nach seiner Etablierung für definierte Proteinpartner treffen lassen.

## **5.2. Validierung von PKB/Akt als Zielprotein in der Tumorthherapie**

Der zweite Teil dieser Promotionsarbeit umfasste die Entwicklung und Charakterisierung zellulärer Systeme zur Validierung von PKB/Akt als Zielstruktur für die Entwicklung neuartiger anti-tumoraler Strategien. PKB/Akt wird in der Literatur als zentraler Mediator von zellulären Überlebenssignalen beschrieben, der in verschiedenen Tumoren konstitutiv aktiviert oder überexprimiert vorliegt und dessen Aktivität möglicherweise Chemoresistenz vermittelt [19, 110-115]. Durch die Etablierung eines geeigneten zellulären Modells wurde die Bedeutung von PKB/Akt bei der Verhinderung des Auftretens von Anoikis herausgestellt. Darüber hinaus konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen konstitutiver Aktivierung von PKB/Akt und der Vermittlung von Chemoresistenz gezeigt sowie molekulare Mechanismen dieser PKB/Akt-vermittelten Chemoresistenz aufgeklärt werden.

### **5.2.1. Charakterisierung genetisch veränderter Zelllinien, die konstitutiv aktives PKB/Akt exprimieren**

Bei der Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der Rolle von PKB/Akt bei der Modulation von Anoikis und der Chemosensitivität von Tumorzellen gegenüber Standard-Chemotherapeutika wurde zunächst ein Derivat von PKB/Akt1 generiert, das unabhängig von der Stimulation durch Wachstumsfaktoren eine konstitutiv aktive Kinaseaktivität aufweist. Die Membranassoziation zur Aktivierung dieses Derivats erfolgt nach Deletion der PH-Domäne (Aminosäuren 1-106) über eine C-terminale Farnesylierung und einen polybasischen Schwanz, der durch Wechselwirkung mit polaren Kopfgruppen der membranständigen Phospholipide für die energetischen Voraussetzungen der Einlagerung des Farnesylrests in die Membran sorgt [163]. Andere in der Literatur beschriebene konstitutiv aktive Derivate von PKB/Akt wurden bislang durch irreversible Myrestylierung dauerhaft mit der Membran assoziiert [162]. Dagegen ist dieses neuartige Konstrukt in der Lage, nach seiner Aktivierung an der Membran und der Abspaltung des Farnesylrests durch Farnesylesterasen ins Zytosol zu dislozieren und so besser zu seinen zellulären Zielproteinen zu gelangen.

Die Funktionalität und konstitutive Aktivierung des CA-PKB/Akt-Derivats zeigte sich bei der Untersuchung des Phosphorylierungsstatus sowie der Kinaseaktivität von ektoischem CA-PKB/Akt in verschiedenen transfizierten Zelllinien. PKB/Akt wird durch Phosphorylierung an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> aktiviert. Ektoische PKB/Akt-Kinase war in selektierten CA-PKB/Akt-exprimierenden Einzelzellklonen der immortalisierten Brustdrüsen-Epithelzelllinie MCF10A, der Ovaradenokarzinom-Zelllinie SK-OV-3 sowie der beiden Lungenkarzinom-Zelllinien A-549 und NCI H460 unabhängig von den Serumbedingungen gleichmäßig an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> phosphoryliert. Die Phosphorylierung von endogenem PKB/Akt hingegen erfolgte in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, wobei nur nach Stimulation mit Serum und Wachstumsfaktoren eine vollständige Phosphorylierung erreicht wurde. In Kinaseaktivitätstests mit immunopräzipitiertem endogenem sowie ektoischem PKB/Akt bestätigte sich, dass Phosphorylierung von PKB/Akt an den Resten Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> mit erhöhter Kinaseaktivität korreliert. Durch Stimulation der Zellen mit Serum und einem Wachstumsfaktorcocktail aus PDGF, EGF und Insulin ließ sich die Kinaseaktivität von endogenem PKB/Akt jeweils steigern, da durch die Initiation verschiedener Wachstumsfaktorrezeptor-Signalwege PI<sub>3</sub>-Kinase und somit auch PKB/Akt aktiviert wird [115]. Bei der Immunpräzipitation von ektoischem CA-PKB/Akt aus SK-OV-3, A-549 und NCI H460-Einzelzellklonen zeigten sich im stimulierten und unstimulierten Zustand keine Unterschiede hinsichtlich der Kinaseaktivität. Besonders wichtig für die nachfolgenden Versuche war die Beobachtung, dass die basale Kinaseaktivität von endogenem PKB/Akt unter Niedrigserumbedingungen in A-549 sowie NCI H460 Zellen relativ gering ausfiel, während sie in SK-OV-3 Zellen bereits sehr groß war. Insgesamt lieferten diese Versuche deutliche Hinweise auf konstitutive Aktivierung des farnesylierten CA-PKB/Akt-Derivats, das aufgrund seiner bereits beschriebenen Vorteile eine sehr gute Alternative zu herkömmlichen myristylierten CA-PKB/Akt-Konstrukten darstellt.

Bei der Bestimmung der Proliferationsrate von Einzelzellklonen aller vier untersuchten Zelllinien fiel auf, dass CA-PKB/Akt-exprimierende Zelllinien deutlich langsamer wuchsen als die entsprechende Kontrollzelllinie. Daher wurden die einzelnen Zelllinien auf die Expression der beiden Zellzyklus-Inhibitoren p21<sup>waf1</sup> und p27<sup>kip1</sup> untersucht. p21<sup>waf1</sup> wurde als p53-abhängiges Genprodukt nach dem Auftreten von DNA-Schäden entdeckt, kann darüber hinaus aber auch unabhängig von p53 induziert werden und G<sub>1</sub>- sowie G<sub>2</sub>-Arrest des Zellzyklus vermitteln [193]. Die Phosphorylierung von Cdc2 an Thr<sup>161</sup> durch p21<sup>waf1</sup> führt zu dauerhaftem G<sub>2</sub>-Arrest nach DNA-Schädigung und zur Verhinderung des Eintritts in die M-Phase [188]. Die erhöhte Expression von p21<sup>waf1</sup> vermittelt Chemoresistenz gegenüber

Zellzyklus-abhängigen Substanzen, insbesondere M-Phase wirksamen Chemotherapeutika wie Taxol oder Doxorubicin [187, 193]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass  $p21^{waf1}$ -defiziente Mäuse ein vermehrtes Auftreten von Spontantumoren zeigten, was die Bedeutung von  $p21^{waf1}$  für die Vermittlung von p53-abhängigem Zellzyklusarrest und der Tumorsuppression unterstreicht [189].  $p27^{kip1}$  vermittelt  $G_1$ -Zellzyklusarrest durch direkte Inhibition von Cyklin E-CDK2 [191]. Viele anti-proliferative Signale wie Wachstumsfaktorentzug, Zell-Zell-Kontakt oder cAMP führen zu einer zellulären Akkumulation von  $p27^{kip1}$  und durch Bindung von  $p27^{kip1}$  in der katalytischen Domäne von CDK2 zum  $G_1$ -Arrest [191, 192]. Der Forkhead-Transkriptionsfaktor AFX reguliert die Transkription von  $p27^{kip1}$  und integriert dabei mitogene sowie PKB/Akt-vermittelte Signale [190]. Die Bedeutung von  $p27^{kip1}$  für die Regulation von zellulärem Wachstum und der Tumorsuppression zeigt sich auch darin, dass  $p27^{kip1}$ -defiziente Mäuse Gigantismus und ein verstärktes Auftreten von Spontantumoren aufweisen [191].

Hinsichtlich der Expression der beiden CDK-Inhibitoren ergab sich für die verschiedenen Zelllinien kein einheitliches Bild: SK-OV-3-Zelllinien zeigten weder Expression von  $p21^{waf1}$  noch von  $p27^{kip1}$ , CA-PKB/Akt-exprimierende A-549-Zellen wiesen im Vergleich zu Kontrollzellen eine leicht erhöhte Expression beider Zellzyklus-Inhibitoren auf, während CA-PKB/Akt-exprimierende MCF10A-Zellen größere Mengen  $p27^{kip1}$  als kontroll-transfizierte MCF10A-Zellen exprimierten. Der deutlichste Unterschied ergab sich bei Betrachtung der  $p21^{waf1}$ -Expression in NCI H460-Zelllinien. Dabei konnte in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen sowohl eine erhöhte Proteinmenge als auch das Auftreten einer Doppelbande detektiert werden, was auf eine Phosphorylierung von  $p21^{waf1}$  schließen lässt.

Diese PKB/Akt-vermittelte Phosphorylierung von  $p21^{waf1}$  an Thr<sup>145</sup> konnte kürzlich auch in HER2-überexprimierenden Zellen gezeigt werden [109, 179]. Phosphoryliertes  $p21^{waf1}$  wird zytosolisch retiniert und bindet an ASK1, wodurch das Auftreten von ASK1-abhängiger Apoptose verhindert wird. Phospho- $p21^{waf1}$  kann somit allerdings nicht mehr als Zellzyklusinhibitor wirken [179]. Auch  $p27^{kip1}$  kann durch PKB/Akt phosphoryliert und auf diese Weise zytosolisch zurückgehalten werden. Phospho- $p27^{kip1}$  ist nun ebenfalls in der Lage, das Auftreten von Apoptose zu verhindern, besitzt aber keine Zellzyklus-arretierende Wirkung mehr [109]. Die hier gefundenen Unterschiede im Expressionsmuster von  $p21^{waf}$  und  $p27^{kip1}$  deuten auf verstärkte Phosphorylierung der beiden Zellzyklusinhibitoren in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen hin. Da weder phospho- $p21^{waf1}$  noch phospho- $p27^{kip1}$  in der Lage sind, Zellzyklusarrest zu vermitteln, scheint es wahrscheinlich, dass neben  $p21^{waf}$  und  $p27^{kip1}$  weitere Faktoren für das verlangsamte Wachstum der CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen

im Vergleich zu Kontrollzellen verantwortlich sind. Hierbei könnten beispielsweise weitere Modifikationen eine Rolle spielen, die die Proteinstabilität verschiedener Cykline, Cytlin-abhängiger Proteinkinasen (CDK) oder CDK-Inhibitoren wie p16<sup>INK4a</sup> beeinflussen.

### 5.2.2. PKB/Akt - ein zentraler Mediator bei der Verhinderung von Anoikis

Nicht-transformierte Zellen unterlaufen in Zellkultur normalerweise Apoptose, wenn sie die Anhaftung an extrazelluläre Matrix verlieren, ein Vorgang, der als Anoikis bezeichnet wird [167]. Der PI<sub>3</sub>-Kinase-Signalweg wird bei Anhaftung von membranständigen Integrinen an extrazelluläre Matrix aktiviert und stellt dabei einen zentralen Mediator von Überlebenssignalen dar [168]. Dies konnte bei der Untersuchung von kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Einzelzellklonen der immortalisierten aber nicht transformierten Brustepithel-Zelllinie MCF10A bestätigt werden. Während Kontrollzellen unter Niedrigserumbedingungen und Verlust der Matrixanhaftung Anoikis unterliefen, konnten CA-PKB/Akt-exprimierende Einzelzellklone unbeeinflusst proliferieren. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und einhergehender Aktivierung des PI<sub>3</sub>-Kinase-Signalwegs ließ sich auch in kontroll-transfizierten MCF10A-Zellen das Auftreten von Anoikis verhindern. Konstitutive Aktivierung von PKB/Akt bzw. die Initiation des PI<sub>3</sub>-Kinase-Signalwegs stellen also wichtige Mechanismen zur Verhinderung von Anoikis dar. Dem Todesrezeptor-Signalweg scheint beim Auftreten von Anoikis und der nachfolgenden Aktivierung von Caspasen eine wichtige Rolle zuzukommen, so dass die Überexpression von Inhibitoren dieser Signalwege wie z.B. c-FLIP oder cIAP einen möglichen Anoikis-Resistenzmechanismus darstellt [167, 194]. PKB/Akt kann nach Aktivierung des Todesrezeptor-Signalwegs durch Caspase 3 an Asp<sup>108</sup> und Asp<sup>119</sup> proteolytisch gespalten und somit inaktiviert werden, was die zentrale Rolle von PKB/Akt bei der Verhinderung von Anoikis unterstreicht [196].

Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um aus ihrer normalen Umgebung zu desintegrieren und in andere Gewebe einzuwandern ohne Anoikis zu unterlaufen. Hierbei kommt insbesondere den Signalmolekülen „Integrin-linked Kinase“ (ILK) und „Focal Adhesion Kinase“ (FAK) sowie dem Adaptermolekül Shc eine besondere Bedeutung zu [167]. ILK interagiert mit membranständigen Integrinen und wird dabei durch die Zell-Matrix-Adhäsion aktiviert. Möglicherweise trägt ILK über die Phosphorylierung von PKB/Akt an Ser<sup>473</sup> zudem zu zellulärem Überleben bei. Auch Shc, dessen Wechselwirkung mit Integrinen noch nicht im Detail aufgeklärt ist, kann durch Bindung von gab2 und grb2 PI<sub>3</sub>-Kinase und somit PKB/Akt aktivieren [167]. Darüber hinaus ist die Tyrosinkinase FAK in

den Fokalkontakten an der Weiterleitung von Signalen der Integrine und von weiteren Adhäsionsrezeptoren beteiligt [180]. Tyrosin-phosphoryliertes FAK aktiviert durch Interaktion mit Proteinen wie beispielsweise Src, Shc, Grb2 oder PI<sub>3</sub>-Kinase verschiedene Signalwege [195]. Eine übermäßige Aktivierung von Shc-, ILK- oder FAK-abhängigen Signalwegen kann also zur Verhinderung von Anoikis beitragen.

Um die Rolle von FAK bei der Modulation von Anoikis näher zu beleuchten, wurden kontroll-transfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen auf FAK-Aktivierung untersucht. Unter Kulturbedingungen ließ sich sowohl in kontroll-transfizierten als auch CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen ein stärkerer Phosphorylierungsgrad und damit einhergehend eine stärkere Kinaseaktivität von FAK detektieren, wenn Zellen adhären konnten verglichen mit Zellen, die nicht an der Matrix anhafteten. Die bei der Anlagerung der Integrine an Matrix-Komponenten und der anschließenden Ausbildung von Integrin-Clustern ausgehenden Signale scheinen u.a. über FAK weitergeleitet zu werden, weswegen FAK bei nicht-Anhaftung der Zellen auch schwächer aktiviert ist [195]. Unter Niedrigserumbedingungen konnte ein gegenteiliges Phänomen beobachtet werden. Zum einen war die Phosphorylierung und somit auch die Kinaseaktivität von FAK generell niedriger als unter Kulturbedingungen, zum anderen war FAK in Zellen, die unter nicht-anhaftenden Bedingungen kultiviert wurden, stärker aktiviert als in adhären Zellen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass FAK nicht nur über Integrin-vermittelte Signale, sondern auch durch eine Reihe weiterer Stimuli aktiviert wird. So vermitteln beispielsweise einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, weitere Oberflächenrezeptoren sowie bestimmte Stresssignale ebenfalls die Phosphorylierung von FAK [195]. Die Kinaseaktivität von FAK war unter Niedrigserumbedingungen in Kontrollzellen niedriger als in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen, was wahrscheinlich auf das Auftreten von Anoikis in Kontrollzellen zurückzuführen ist, während CA-PKB/Akt-exprimierende MCF10A Zellen auch unter diesen Bedingungen überleben konnten.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten experimentellen Daten sowie die Tatsache, dass verschiedene Tumorzelllinien durch Verringerung der Expression von PKB/Akt1 nicht mehr in der Lage sind, nach Verlust der Matrixanhaftung zu proliferieren und Apoptose zu unterlaufen [197], unterstreichen die Bedeutung von PKB/Akt in der Verhinderung des Auftretens von Anoikis. FAK bildet einen integralen Bestandteil des Integrin-Signalwegs, kann aber auch durch weitere Faktoren aktiviert werden. In MCF10A Zellen geht die Aktivierung von FAK unter Kulturbedingungen mit der Zelladhäsion einher, während unter Niedrigserumbedingungen zusätzliche Faktoren für die Aktivierung von FAK bedeutsam

sind. Insgesamt konnte PKB/Akt als ein wichtiger Mediator von Signalen zur Verhinderung von Anoikis identifiziert werden. Zur Aufklärung der genauen Bedeutung von FAK bei der Aktivierung verschiedener Signalwege nach Verlust der Matrixanhaftung bedarf es weiterer eingehenderer Untersuchungen.

### 5.2.3. PKB/Akt vermittelt Chemoresistenz *in vitro* und *in vivo*

Neben der Verhinderung von Anoikis und der Verminderung apoptotischer Signale wird eine Beteiligung von PKB/Akt bei der Vermittlung von Chemoresistenz diskutiert. So zeigte sich ovariäre Tumorzellen, die konstitutiv aktives PKB/Akt exprimierten oder eine Amplifikation des Akt2-Gens aufwiesen, gegenüber der Behandlung mit Paclitaxel deutlich weniger sensitiv als Tumorzellen, die eine niedrige PKB/Akt Expression besaßen [114]. Auch in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien konnte eine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt detektiert werden, die zu einem verminderten zellulären Ansprechen auf Chemotherapeutika und Bestrahlung führte [18]. Zur Untersuchung, ob die im Rahmen dieser Promotionsarbeit generierten Zelllinien ebenfalls verstärkte Chemoresistenz aufwiesen, wurden kontrolltransfizierte und CA-PKB/Akt-exprimierende SK-OV-3, MCF10A, A-549 und NCI H460 Zelllinien auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Zellzyklus-abhängigen (Taxol, 5-FU) bzw. Zellzyklus-unabhängigen Chemotherapeutika (Mitoxantron, Cis Platin, Doxorubicin) untersucht. Zellzyklus-abhängige Zytostatika wirken ausschließlich, wenn Zellen sich teilen und den Zellzyklus durchlaufen: Der Antimetabolit 5-FU wirkt in der S-Phase und hemmt die DNA- sowie die RNA-Synthese, während Zellen nach Behandlung mit Taxol nicht in der Lage sind, die Mitose vollständig zu durchlaufen. Zellzyklus-unabhängige Chemotherapeutika hingegen können ihre Wirkung ohne das Durchlaufen des Zellzyklus entfalten. Ihre Wirkung ist daher unabhängig von der Proliferation der Zellen [15].

Eine sehr starke PKB/Akt-vermittelte Chemoresistenz zeigte sich in den beiden Lungenkarzinomzelllinien A-549 und NCI H460, wobei die deutlichsten Effekte bei der Behandlung mit Zellzyklus-unabhängigen Chemotherapeutika zu beobachten waren. CA-PKB/Akt-exprimierende MCF10A Zellen wiesen im Vergleich zur Kontrollzelllinie eine schwache Desensitivierung gegenüber den getesteten Chemotherapeutika auf, während sich in SK-OV-3 Zelllinien keine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den getesteten Zytostatika detektieren ließen. Letztere Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass SK-OV-3 Zellen bereits unter Niedrigserumbedingungen eine sehr hohe endogene PKB/Akt-Kinaseaktivität aufwiesen, so dass sich durch zusätzliche Expression von ektoischem CA-PKB/Akt keine weitergehenden Effekte erzielen ließen. Konstitutive Aktivierung von PKB/Akt führt also *in*

*in vitro* zu einer Desensitivierung der Zelllinien MCF10A, A-549 sowie NCI H460 insbesondere gegenüber Zellzyklus-unabhängigen Chemotherapeutika.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte darüber hinaus erstmalig gezeigt werden, dass PKB/Akt auch *in vivo* eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von Chemoresistenz spielt. In einem Xenograft Modell in Nacktmäusen mit humanen CA-PKB/Akt-exprimierenden bzw. kontroll-transfizierten NCI H460 Zelllinien zeigte sich eine deutliche PKB/Akt-vermittelte Desensitivierung gegenüber verschiedenen Zytostatika. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Experimenten, bei denen sich eine PKB/Akt-vermittelte Chemoresistenz insbesondere bei Behandlung der Zellen mit Zellzyklus-unabhängigen Substanzen beobachten ließ, wiesen CA-PKB/Akt-exprimierende Tumore im Vergleich zu Kontrolltumoren eine Desensitivierung sowohl gegenüber Zellzyklus-abhängigen (Taxol, 5-FU) als auch gegenüber Zellzyklus-unabhängigen Chemotherapeutika (Cis Platin, Doxorubicin, Cyclophosphamid) auf.

CA-PKB/Akt-exprimierende Tumore zeigten im Vergleich zu Kontrolltumoren entgegen den Ergebnissen in den *in vitro*-Experimenten keine Desensitivierung gegenüber Mitoxantron. Wie schon bei der weiterreichenderen PKB/Akt-vermittelten Chemoresistenz *in vivo*, wird hierbei deutlich, dass sich die Aufnahme, die Metabolisierung und die Wirksamkeit der Zytostatika im soliden Tumor und in Zellkultur stark unterscheiden können. Auffällig bei den *in vivo*-Experimenten war darüber hinaus, dass Zytostatika behandelte CA-PKB/Akt-exprimierende Tumore oftmals deutlich schneller wuchsen als unbehandelte CA-PKB/Akt-exprimierende Tumore. Es wäre denkbar, dass die PKB/Akt-vermittelte Chemoresistenz möglicherweise mit einer erhöhten Zellteilungs- und Proliferationsrate beim Auftreten zellulärer Stresssignale wie beispielsweise der Behandlung mit Chemotherapeutika einhergeht.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse aus den *in vitro*- und den *in vivo*-Experimenten, dass PKB/Akt neben seiner anti-apoptotischen Funktion und seiner Bedeutung in der Vermittlung von zellulären Überlebenssignalen auch ein zentraler Mediator von Chemoresistenz ist. Das im Rahmen dieser Promotionsarbeit etablierte Tiermodell stellt zudem ein bedeutendes Instrument zur Evaluierung potentieller PKB/Akt-Inhibitoren dar. Ein potentieller Inhibitor von PKB/Akt sollte in der Lage sein, PKB/Akt-vermittelte Chemoresistenz zu durchbrechen und CA-PKB/Akt-exprimierende Xenografts gegenüber der Behandlung mit Zytostatika so zu sensitivieren, dass CA-PKB/Akt-exprimierende Tumore das gleiche Ansprechverhalten auf Zytostatika aufweisen wie NCI H460 Kontrolltumore.

#### 5.2.4. Mechanismen PKB/Akt-vermittelter Chemoresistenz

Die meisten der heute in der Klinik verwendeten Chemotherapeutika töten Tumorzellen über die Induktion von Apoptose [173]. Bei der Auslösung von Apoptose spielen verschiedene



Signalwege eine Rolle: Neben der Expression bzw. Freisetzung von Proteinen, die direkt Apoptose induzieren können, wie beispielsweise der „Apoptosis inducing Factor“ (AIP) [199] leiten membranständige Rezeptoren (sogenannte Todesrezeptoren wie TNF $\alpha$ - oder Fas-Rezeptoren), die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien vermittelt durch proapoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie sowie die Induktion des Tumorsuppressorproteins p53 nach dem Auftreten von DNA-Schäden die Initiation von Apoptose ein [66, 173]. Während AIP Apoptose unabhängig von der Aktivierung von Caspasen auslösen kann, stellt die Aktivierung von Caspasen einen integralen Bestandteil der anderen drei Signalwege dar [198]. Zytostatika-vermittelte Apoptose wird größtenteils durch Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs initiiert. Caspase 8 fungiert hierbei als nachgeschaltete Effektor-Caspase und nicht als Initiator-Caspase [210]. In der Literatur konnte kürzlich die Bedeutung sowohl von Caspase 8 als auch von Caspase 9 für die Auslösung von Apoptose in NCI H460 Zellen gezeigt werden. Hierbei schien jedoch insbesondere der Caspase 8 und weniger der Caspase 9 eine apikale Rolle in der Initiation von Apoptose nach Behandlung mit Zytostatika zuzukommen. Die Aktivierung von Caspase 8 erfolgte dabei aber nur in Abhängigkeit von Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien möglicherweise mittels Interaktion mit Apaf-1 und durch Ausbildung eines alternativen „Apoptosoms“ [212].

Bei der molekularen Untersuchung der PKB/Akt-vermittelten Desensitivierung von NCI H460 Zellen gegenüber Cis Platin und Mitoxantron zeigte sich, dass PKB/Akt durch breit gefächerte Eingriffe in die apoptotischen Hauptsignalwege Chemoresistenz über eine Vielzahl von Mechanismen vermittelt. Die im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich verlangsamte Induktion von Apoptose in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen nach Zytostatika-Behandlung korrelierte mit quantitativen Unterschieden in der Aktivierung von Initiator- und Effektor-Caspasen. Während Kontrollzellen nach Behandlung mit Cis Platin eine starke proteolytische Spaltung der beiden Initiator-Caspasen 8 und 9, der Effektor-Caspasen 3 und 7 sowie des Caspase-Substrates PARP aufwiesen, zeigten CA-PKB/Akt-exprimierende Zellen nur eine wesentlich schwächere Aktivierung der Schlüssel-Caspasen 8 und 9 sowie der Effektor-Caspase 7 aber keine Aktivierung von Caspase 3 und Spaltung von PARP. Ein ähnliches Bild ergab sich bei Behandlung der Zelllinien mit Mitoxantron, wobei die Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden und kontroll-transfizierten Zellen im Vergleich zur Behandlung mit Cis Platin geringer ausgeprägt waren und die Initiator-Caspase 8 in beiden Zelllinien nur sehr schwach aktiviert wurde.

Die Caspasen 8 und 9 stehen jeweils an der Spitze zweier proteolytischer Caspase-Kaskaden, die durch Initiation verschiedener Effektor-Caspasen zelluläre Proteine spalten und so zu

DNA-Fragmentierung, Schrumpfung der Zelle und schließlich Zelltod führen [67-69]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die differenzielle Aktivierung der Effektor-Caspasen 3/7 sowie die differenzielle Spaltung des nukleären Proteins PARP, in kontroll-transfizierten versus CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien aus der stärkeren Aktivierung der beiden Initiator-Caspasen 8 und 9 resultiert.

### **CA-PKB/Akt moduliert insbesondere den mitochondrialen Apoptose-Signalweg**

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass PKB/Akt in beide apoptotischen Hauptsignalwege eingreifen und dadurch apoptotische Stimuli unterdrücken kann. So ist PKB/Akt in der Lage, zum einen durch Phosphorylierung der Initiator-Caspase 9 sowie des proapoptotischen Bcl-2-Homologs Bad den mitochondrialen Signalweg, zum anderen durch Phosphorylierung von Forkhead Transkriptionsfaktoren, die die Expression des Fas-L modulieren, den Todesrezeptor-Signalweg negativ zu regulieren [116]. Die differenzielle Aktivierung der beiden Initiator-Caspasen 8 bzw. 9 in NCI H460 Zelllinien nach Zytostatika-Behandlung lässt darauf schließen, dass sowohl der Todesrezeptor-vermittelte als auch der mitochondriale Signalweg durch Expression von CA-PKB/Akt gehemmt werden. Insbesondere innerhalb des mitochondrialen Signalwegs konnten im Rahmen dieser Promotionsarbeit Modifikationen detektiert werden, die für das Auftreten von PKB/Akt-vermittelter Chemo-resistenz verantwortlich sein könnten.

Der initiale Schritt der Caspase 9 Aktivierung liegt in der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol. Zytosolisches Cytochrom C kann nach seiner Freisetzung an Apaf-1 binden. Gemeinsam mit Caspase 9 aggregiert dieser Komplex zum „Apoptosom“, einem 700kDa Proteinkomplex, innerhalb dessen es zur Aktivierung von Caspase 9 kommt [88-90]. Mögliche regulative Eingriffe in die Initiation der Caspase 9 Aktivierung stellt einerseits eine Veränderung der Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie oder deren Modifikation beispielsweise durch Phosphorylierung dar [202]. Zum anderen führt eine Inaktivierung von Apaf-1, dessen Expression nach dem Auftreten von DNA-Schäden p53-abhängig induziert wird [170], zum Verlust der Caspase 9 Aktivierung und somit zur Vermittlung von Chemo-resistenz in verschiedenen malignen Melanomen [201]. Weder bei der Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien noch bei der Induktion der Expression von Apaf-1 zeigten sich nach Behandlung mit Mitoxantron und Cis Platin Unterschiede zwischen kontroll-transfizierten und CA-PKB/Akt-exprimierenden Zelllinien. Allerdings konnte in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen insbesondere unter Niedrigserumbedingungen eine verstärkte Phosphorylierung von Pro-Caspase 9 an Ser<sup>196</sup> beobachtet werden. Diese bereits in der Literatur beschriebene PKB/Akt-vermittelte

Phosphorylierung von Pro-Caspase 9 verhindert die Spaltung von Pro-Caspase 9 und somit die Initiation der proteolytischen Caspase-Kaskade [171]. Da die Behandlung der Zellen mit Zytostatika unter Niedrigserumbedingungen durchgeführt wurde, scheint es möglich, dass Pro-Caspase 9 in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen aufgrund der verstärkten Phosphorylierung an Ser<sup>196</sup> schwächer aktiviert wurde als in Kontrollzellen.

Ein weiteres anti-apoptotisches Signal wurde bei der Analyse der Expressionslevel verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie detektiert: Die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> war in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen gegenüber Kontrollzellen deutlich erhöht. Bcl-x<sub>L</sub> ist in der Lage, zytosolisches Cytochrom C zu binden und auf diese Weise das Auftreten von Apoptose zu verhindern [86]. So führt zum Beispiel eine Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> in LNCaP- und PC-3-Zellen zu einer Desensitivierung gegenüber der Behandlung mit Zytostatika [208]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation des PI<sub>3</sub>-Kinase-PKB/Akt-Signalwegs die Expression von Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA ansteigt [207]. Bei der Untersuchung der Freisetzung von Cytochrom C nach Behandlung mit Zytostatika hatten sich keine Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen und Kontrollzellen ergeben. Durch die verstärkte Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und dessen Bindung an zytosolisches Cytochrom C wäre es jedoch möglich, dass im Zytosol von CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen weniger Cytochrom C zur Bindung an Apaf-1 und somit zur Aktivierung von Pro-Caspase 9 zur Verfügung steht als in Kontrollzellen.

Der Fas-Rezeptor Signalweg spielt in der Zytostatika-vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle [173]. Die Exposition von Zellen mit bestimmten Chemotherapeutika führt zum p53-vermittelten Transport von Fas-R aus dem Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, wo diese trimerisieren und somit die Bildung des „Death-inducing signaling complex“ (DISC) aus dem Adaptermolekül FADD und Pro-Caspase 8 induzieren können [175, 209]. Die Aktivierung von Pro-Caspase 8 kann durch die Interaktion von c-FLIP mit dem DISC inhibiert werden [74, 75]. Bei der Analyse dieses Signalwegs zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen und Kontrollzellen bezüglich der Expression von FADD, c-FLIP und Fas-R sowie dessen Translokation an die Zelloberfläche.

In der Literatur wird insbesondere eine Beteiligung des PI<sub>3</sub>-Kinase-PKB/Akt-Signalwegs bei der Modulation der Expression des Caspase 8-Inhibitors c-FLIP diskutiert. Durch Inhibition dieses Signalweges mittels des PI<sub>3</sub>-Kinase-Inhibitors LY294002 ließ sich die Expression von c-FLIP in verschiedenen Tumorzelllinien sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene senken, während durch Expression eines konstitutiv aktiven PKB/Akt-Derivats die intrazelluläre c-FLIP-Expression gesteigert werden konnte [211]. Eine solche Modulation der Expression

verschiedener Splice-Varianten von c-FLIP wurde jedoch in CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen verglichen mit den Kontrollzellen nicht beobachtet.

### **Konstitutive Aktivierung von PKB/Akt verzögert die Initiation des p53 Signalweges**

Nach dem Auftreten von DNA-Schäden, die beispielsweise durch Behandlung von Zellen mit Zytostatika hervorgerufen werden können, wird ein weiterer bedeutender apoptotischer Signalweg aktiviert, bei dem das Tumorsuppressorprotein p53 eine Schlüsselfunktion besitzt. Die Aktivierung von p53 erfolgt mittels Phosphorylierung an mehreren Serin-Resten durch verschiedene Serin-/Threonin-Kinasen wie ATM, ATR, DNA-PK oder Chk2 und führt zur Translokation von p53 in den Zellkern. Dort kann phosphoryliertes p53 die Transkription verschiedener Gene induzieren: Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup> reguliert die transkriptionelle Aktivität von p53 durch Induktion der Expression von MDM2, Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup> und Ser<sup>20</sup> führt zur Induktion der Expression von p21 und PCNA und somit zu Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, während Phosphorylierung an Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>20</sup> und Ser<sup>46</sup> u.a. durch transkriptionelle Repression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und die Induktion der pro-apoptotischen Proteine Bax und AIP das Auftreten von Apoptose und die Initiation einer Caspase-Kaskade vermittelt [97-109].

Sowohl bei Behandlung der Zellen mit Cis Platin als auch mit Mitoxantron ließ sich in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen verglichen mit Kontrollzellen eine deutlich verlangsamte Hochregulation von p53 beobachten, während die Phosphorylierung von p53 an den Resten Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>20</sup> und Ser<sup>46</sup> in beiden Zelllinien zum gleichen Zeitpunkt auftrat. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass es durch konstitutive Aktivierung der PI<sub>3</sub>-Kinase bzw. von PKB/Akt zu einer signifikanten Verschiebung der Induktion von p53-vermittelter Apoptose kommt [182]. Die gleichzeitige Phosphorylierung von p53 in beiden Zelllinien nach dem Auftreten von DNA-Schäden vermittelt durch die Behandlung mit Zytostatika deutet darauf hin, dass es keine Unterschiede in der Aktivierung der verschiedenen, p53-phosphorylierenden Serin-/Threonin-Kinasen gibt, sondern dass Unterschiede beim Auftreten der p53-vermittelten Apoptose in einem nachgeschalteten Mechanismus begründet liegen müssen. p53 kann sowohl Transkriptions-abhängige als auch Transkriptions-unabhängige Apoptose vermitteln. Bei Analyse der Transkriptions-abhängigen Mechanismen wie der Induktion der Proteine p21 bzw. Bax konnten keine Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden und kontroll-transfizierten Zellen beobachtet werden. Die Initiation von Caspasen zählt zu den Transkriptions-unabhängigen Mechanismen der p53-vermittelten Apoptose, wobei der genaue Ablauf der Caspase-Aktivierung noch nicht aufgeklärt ist. Neben der Aktivierung von Caspase 9 konnte auch der Aktivierung von Caspase 8 innerhalb eines

ca. 600kDa-Komplexes eine bedeutende Rolle bei der p53-vermittelten Apoptose zugewiesen werden [213]. Somit ist vorstellbar, dass PKB/Akt neben der Modulation des mitochondrialen Signalweges Chemoresistenz durch die verzögerte Induktion von p53 und einhergehende verzögerte Initiation der Caspasen 8 und 9 hervorruft.

#### 5.2.5. Besitzt PKB/Akt eine pro-apoptotische Funktion ?

Wider Erwarten waren CA-PKB/Akt-exprimierende NCI H460-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen sensitiver gegenüber der Behandlung mit den apoptotischen Zytokinen TNF $\alpha$  und Fas-L. Bisherige Untersuchungen in der Literatur hatten hingegen bei konstitutiver Aktivierung von PKB/Akt eine Desensitivierung gegenüber TNF $\alpha$ - bzw. Fas-L-induzierter Apoptose ergeben. Eine wichtige Rolle bei der Desensitivierung muriner Hepatozyten gegenüber der Behandlung mit diesen beiden Zytokinen scheint die verstärkte Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch PKB/Akt zu spielen [185]. Der Einfluss von PKB/Akt auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist in der Literatur allerdings umstritten [141, 214]. In den hier durchgeführten Experimenten mit NCI H460-Zelllinien konnten keine Unterschiede in der Induktion von NF- $\kappa$ B zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden und kontroll-transfizierten Zellen nach Behandlung mit TNF $\alpha$  beobachtet werden. Unterschiede in NCI H460-Zelllinien zeigten sich allerdings bei Betrachtung der Aktivierung von Caspase 8, die sowohl nach Behandlung mit TNF $\alpha$  als auch mit Fas-L in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen deutlich stärker war als in Kontrollzellen und die mit dem Auftreten von Apoptose korrelierte. Da sich keine Expressionsunterschiede der Adaptermoleküle TRADD, FADD und RIP sowie der Caspase 8 Inhibitoren Flip  $\alpha$  und  $\beta$  zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden und kontroll-transfizierten Zellen detektieren ließen, wäre es denkbar, dass möglicherweise Modifikationen dieser oder weiterer Proteine des Caspase 8-Signalwegs für die verstärkte Aktivierung von Caspase 8 verantwortlich sind. Auch ein verändertes Phosphorylierungsmuster des Hitzeschockproteins 27 (Hsp27), das bei der Verhinderung von DAXX- und Ask1-vermittelter Apoptose eine wichtige Rolle spielt, könnte die PKB/Akt-vermittelte Sensitivierung gegenüber Fas-L- und TNF $\alpha$ -Behandlung hervorrufen [186, 216].

Auch bei Analyse der Gesamtexpression des Fas- bzw. des TNF $\alpha$ -Rezeptors konnten keine Unterschiede zwischen CA-PKB/Akt-exprimierenden und kontroll-transfizierten Zellen detektiert werden. Es wäre allerdings denkbar, dass die Zytokin-Rezeptoren in CA-PKB/Akt-exprimierenden Zellen in größerem Maße in der Zellmembran lokalisiert sind oder dort einfacher trimerisieren können, was eine Sensitivierung gegenüber den apoptotischen Zytokinen Fas-L und TNF $\alpha$  erklären könnte. So wurde in der Literatur beispielsweise eine

verstärkte Expression der Zytokin-Rezeptoren TRAIL-R1/2, vermittelt durch die c-Rel Untereinheit des NK- $\kappa$ B Transkriptionsfaktors, beobachtet, was das Auftreten von Apoptose nach TRAIL-Behandlung erleichterte [215]. Aussagen über eventuelle Unterschiede in der Oberflächenexpression oder der Trimerisierung der Rezeptoren ließen sich mit Hilfe von zusätzlichen FACS- bzw. FRET-Experimenten treffen. Die in der Western Blot Analyse unter Kulturmedium-Bedingungen detektierbare zweite Bande bei Analyse der Expression des TNF $\alpha$ -Rezeptors böte einen weiteren möglichen Ansatzpunkt für zusätzliche Untersuchungen der Sensitivierung von CA-PKB/Akt-exprimierenden NCI H460 Zellen gegenüber Fas-L bzw. TNF $\alpha$ -Behandlung. Möglicherweise handelt es sich dabei um Modifikationen des TNF-R1 oder um die Expression einer zusätzlichen Splice-Variante des TNF-R1.

Eine Sensitivierung CA-PKB/Akt-exprimierender Zellen gegenüber der Behandlung mit Fas-Ligand und TNF $\alpha$  ließ sich außer in NCI H460-Zellen in keiner anderen Zelllinie zeigen. Während MCF10A- und SK-OV-3-Zelllinien keine Sensitivität gegenüber den beiden apoptotischen Zytokinen aufwiesen, möglicherweise weil sie kein intaktes p53-Protein exprimieren [99], war die klonale Varianz in A-549-Zellen zu groß, um eine definitive Aussage über die Modifikation der Sensitivität gegenüber diesen apoptotischen Stimuli durch die Expression von CA-PKB/Akt zu treffen. Interessant wäre daher zum einen die Untersuchung weiterer Wildtyp p53-exprimierender Zelllinien nach Expression von CA-PKB/Akt sowie zum anderen die Behandlung von NCI H460 Zelllinien mit weiteren Zytokinen wie beispielsweise TRAIL, ehe PKB/Akt neben seiner Bedeutung bei der Vermittlung anti-apoptotischer Signale auch eine pro-apoptotische Funktion zugesprochen werden kann.

#### 5.2.6. PKB/Akt als potentielle Zielstruktur für anti-tumorale Strategien

PKB/Akt wird in der Literatur als zentraler Mediator von zellulären Überlebenssignalen beschrieben, dessen Isozyme in einer Vielzahl verschiedener humaner Tumore wie beispielsweise Gliome, Magen-, Prostata-, Brust-, Ovarial- oder Pankreaskarzinome in amplifizierter und/oder konstitutiv aktivierter Form vorliegt [109-115]. Manche dieser Tumore (insbesondere Gliome und Pankreastumore) sind als intrinsisch chemoresistent beschrieben und es bestehen keine effektiven Chemotherapie-Optionen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte eine direkte Beteiligung von PKB/Akt bei der Vermittlung von Chemoresistenz *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Somit stellt PKB/Akt eine interessante Zielstruktur für therapeutische Eingriffe dar, die zum einen auf eine verstärkte Unterdrückung tumorzellulärer Überlebenssignale und zum anderen auf eine Resensitivierung von Tumoren

gegenüber der Behandlung mit klinisch eingesetzten Standard-Chemotherapeutika abzielt. Die Inhibition der zellulären Kinaseaktivität von PKB/Akt könnte sich also positiv auf die Behandelbarkeit verschiedener Tumore auswirken. Andererseits ist PKB/Akt ein ubiquitär exprimiertes Protein, das an der Regulation verschiedener zellulärer Funktionen - u.a. auch der Glucose-Homöostase - beteiligt ist. Ein potentieller Inhibitor von PKB/Akt könnte somit *in vivo* eine Reihe von Nebenwirkungen besitzen. Zwei kürzlich in der Literatur beschriebene knock-out Mausmodelle lieferten Einblicke in das Nebenwirkungsspektrum bei Verlust der PKB/Akt Funktion. Insbesondere PKB/Akt2(-/-) knock-out Mäuse wiesen dabei eine Beeinflussung des Glucosestoffwechsels (Hyperglykämie), Insulin-Resistenz und ein mildes, Diabetis mellitus-ähnliches Syndrom auf, während PKB/Akt1(-/-) knock-out Mäuse organische Wachstumsstörungen und ansonsten einen relativ milden Phänotyp zeigten [205, 206]. Auffällig war, dass die metabolischen Abnormitäten, die durch das Fehlen von PKB/Akt2 hervorgerufen wurden, durch PKB/Akt1 und 3 nicht kompensiert werden konnten. PKB/Akt2 scheint somit einen deutlich größeren Einfluss auf den Glucosestoffwechsel zu besitzen als die beiden anderen Isoformen. Der relativ milde Phänotyp in PKB/Akt1 knock-out Mäusen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass PKB/Akt2 und 3 teilweise zelluläre Aufgaben von PKB/Akt1 übernehmen können. Ein selektiver Hemmstoff von PKB/Akt1 wäre daher für die Tumorthherapie geeignet, da insbesondere der Glucosestoffwechsel nur in geringem Maße beeinflusst würde. Aufgrund der großen Homologie der Kinasedomänen von PKB/Akt1, 2 bzw. 3 und der in der Regel ATP-kompetitiven Eigenschaften von Kinaseinhibitoren ist eine solche Selektivität wohl nur schwer zu erreichen.

Die selektive Inhibition der Kinaseaktivität von PKB/Akt stellt trotz seiner zu erwartenden Nebenwirkungen einen interessanten Ansatz für neuartige therapeutische Strategien dar, da es sich bei einem behandelbaren, transienten diabetischen Phänotyp sicherlich um ein abwägbares Risiko handelt. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit nachgewiesene direkte Korrelation zwischen konstitutiver PKB/Akt-Aktivierung und dem Auftreten von Chemoresistenz *in vivo* bildet die Grundlage für die Entwicklung neuartiger Therapieansätze. Dabei können Tumorzellen, die Chemoresistenz aufgrund einer hohen intrinsischen Aktivität von PKB/Akt aufweisen, durch Applikation eines PKB/Akt-Inhibitors gegenüber Standard-Chemotherapeutika resensitiviert und auf diese Weise eine Vielzahl von chemoresistenten Tumoren einer Therapie zugänglich gemacht werden. Aufgrund der Attraktivität des Zielmoleküls PKB/Akt ist zu erwarten, dass in Kürze selektive Kinaseinhibitoren entwickelt und klinischer Prüfung unterzogen sein werden. Die Ergebnisse dieser klinischen Studien werden letztendlich Aufschluss über die Tragweite dieses therapeutischen Konzepts geben.

## 6. Zusammenfassung

Der erste Teil dieser Promotionsarbeit umfasste die Etablierung und Validierung eines *in vitro* Testsystems zur Auffindung von Substanzen, die selektiv die Interaktion der mitogenen Signalmoleküle Ras und Raf inhibieren können. Die Deregulation der Ras-Signalkaskade spielt in einer Vielzahl maligner Transformationen eine bedeutende Rolle. Daher besteht in der pharmazeutischen Forschung großes Interesse an der Auffindung von Inhibitoren, die in der Lage sind, solche proliferativen Signale zu unterbinden und möglicherweise Ras-vermittelte Malignität einzudämmen.

Das im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelte Testsystem zur Detektion von Inhibitoren der Ras-Raf-Proteininteraktion basiert auf der intracistronischen  $\beta$ -Galaktosidase Komplementation. Hierbei werden zwei sich nicht komplementierende Deletionsmutanten der  $\beta$ -Galaktosidase, deren Affinität zueinander sehr niedrig ist, mit interagierenden Proteinpaaren fusioniert, wodurch es zur Ausbildung eines aktiven Enzymkomplexes kommen kann, dessen Aktivität sich über die Umwandlung eines fluorogenen Substrats nachweisen lässt. Bei Expression der interagierenden Fusionsproteine im *E. coli* Stamm ER2507 zeigte sich in intakten Zellen eine spezifische Komplementation der Interaktionspartner. Eine *in vitro* Komplementation der Fusionsproteine konnte trotz nativer Aufreinigung nicht beobachtet werden, da die Proteine im zellfreien System unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur sehr schwach miteinander interagierten. Das zelluläre Testsystem ließe sich in dieser Form für die Wirkstoffsuche nach Inhibitoren der Ras-Raf-Proteininteraktion einsetzen. Die Evaluierung und Validierung muss aber für jedes interagierende Proteinpaar gesondert erfolgen.

Der zweite Teil dieser Promotionsarbeit umfasste die Entwicklung und Charakterisierung zellulärer Systeme zur Validierung von PKB/Akt als Zielstruktur für die Entwicklung neuartiger anti-tumoraler Strategien. PKB/Akt wird in der Literatur als zentraler Mediator von zellulären Überlebenssignalen beschrieben. Zudem weisen verschiedene Tumore eine konstitutive Aktivierung und/oder eine Überexpression von PKB/Akt auf, was möglicherweise mit dem Auftreten von Chemoresistenz korreliert.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte durch die Etablierung eines geeigneten zellulären Modells die Bedeutung von PKB/Akt bei der Verhinderung des Auftretens von Anoikis herausgestellt werden. Darüber hinaus gelang es erstmals, einen kausalen Zusammenhang zwischen konstitutiver Aktivierung von PKB/Akt und der Vermittlung von Chemoresistenz *in vitro* als auch *in vivo* darzulegen. Bei der molekularen Untersuchung der PKB/Akt-vermittelten Desensitivierung von Lungenkarzinomzellen gegenüber Zytostatika zeigte sich,



dass PKB/Akt Chemoresistenz durch breit gefächerte Eingriffe in die apoptotischen Haupt-signalwege über eine Vielzahl von Mechanismen wie beispielsweise die verstärkte Phosphorylierung der Initiator-Caspase 9, die erhöhte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x<sub>L</sub> oder die verlangsamte Induktion von p53 vermittelt.

Die selektive Inhibition der Kinaseaktivität von PKB/Akt stellt somit einen interessanten Ansatz für neuartige therapeutische Strategien dar, die darauf abzielen, Tumorzellen, die Chemoresistenz aufgrund einer hohen intrinsischen Aktivität von PKB/Akt aufweisen, durch Applikation eines PKB/Akt-Inhibitors gegenüber Standard-Chemotherapeutika zu resensitivieren und auf diese Weise eine Vielzahl von chemoresistenten Tumoren einer Therapie zugänglich zu machen.

## 7. Literatur

- [1] Ries LAG, Hankey BF, Edwards BK. Cancer Statistics review 1973-1987. (1990) *NIH Publ.* 2789-2790, NIH, Bethesda, MD, USA.
- [2] Okano M, Gross TG. From Burkitt's lymphoma to chronic active Epstein-Barr virus (EBV) infection: an expanding spectrum of EBV-associated diseases. (2001) *Pediatr. Hematol. Oncol.*, **18**:427-442.
- [3] Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. (2001) *Int. J. Exp. Pathol.*, **82**:77-100.
- [4] Bechi P, Balzi M, Becciolini A, Maugeri A, Raggi CC, Amorosi A, Dei R. *Helicobacter pylori* and cell proliferation of the gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis. (1996) *Am. J. Gastroenterol.*, **91**:271-276.
- [5] Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Micklem G, Barfoot R, Hamoudi R, Patel S, Rice C, Biggs P *et. al.*. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. (1995) *Nature*, **378**:789-792.
- [6] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman, K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennet LM, Ding W *et. al.*. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. (1994) *Science*, **266**:66-71.
- [7] Zajac V, Tomka M, Ilencikova D, Majek P, Stevurkova V, Kirchhoff T. A double germline mutations in the APC and p53 genes. (2000) *Neoplasma*, **47**:335-341.
- [8] Klein G, Klein E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. (1985) *Nature*, **315**:190-195.
- [9] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. (1990) *Cell*, **61**:759-767.
- [10] Kurebayashi J. Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. (2001) *Breast Cancer*, **8**:45-51.
- [11] Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. (2000) *Oncogene*, **19**:6594-6599.
- [12] Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. (2000) *Carcinogenesis*, **21**:485-495.
- [13] Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R, Terakawa N. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**:892-895.
- [14] Lilja JF, Wu D, Reynolds RK, Lin J. Growth suppression activity of the PTEN tumor suppressor gene in human endometrial cancer cells. (2001) *Anticancer Res.*, **21**:1969-1974.
- [15] Mutschler E. Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. (1996) *Wiss. Verl.-Ges. mbH*, Stuttgart, 7. Auflage:739-762.
- [16] Houghton PJ, Kaye SB. Multidrug resistance is not an important factor in therapeutic outcome in human malignancies. (1994) *J. NIH Res.*, **6**:55.
- [17] Hochhauser D, Harris AL. Drug resistance. (1991) *Br. Med. Bull.*, **47**:178-196.
- [18] Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. (2001) *Cancer Res.*, **61**:3986-3997.
- [19] Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, Bernet V, Burman KD, Kohn LD, Saji M. Overexpression and overactivation of akt in thyroid carcinoma. (2001) *Cancer Res.*, **61**:6105-6111.
- [20] Hernandez-Alcoceba R, del Peso L, Lacal JC. The Ras family of GTPases in cancer cell invasion. (2000) *Cell. Mol. Life. Sci.*, **57**:65-76.
- [21] Stacey DW. The ras pathway: a model for the control of proliferation in animal cells. (1988) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **234**:141-167.
- [22] Liu D, Wang LH. Oncogenes, Protein Tyrosine Kinases, and Signal Transduction. (1994) *J. Biomed. Sci.*, **1**:65-82.
- [23] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. (2001) *Nature*, **411**:355-364.
- [24] Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP Kinase Cascade by Ras and Raf. (1996) *Cancer Surveys*, **27**:101-125.

- [25] Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing Complexity of Ras signalling. (1998) *Oncogene*, **17**:1395-1413.
- [26] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, 896-910, Verlag VCH
- [27] Warne PH, Viciano PR, Downward J. Direct Interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. (1993) *Nature*, **364**:352-355.
- [28] Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. (1993) *Cell*, **74**:205-214.
- [29] Hallberg B, Rayter SI, Downward J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**:3913-3916.
- [30] Marshall M. Interactions between Ras and Raf: Key regulatory proteins in cellular transformation. (1995) *Mol. Repro. Dev.*, **42**:493-499.
- [31] Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. (1997) *Curr. Op. Cell Biol.*, **9**:174-179.
- [32] Yip-Schneider MT, Miao W, Lin A, Barnard DS, Tzivion G, Marshall MS. Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. (2000) *Biochem. J.*, **351**:151-159.
- [33] Weber, CK, Slupsky JR, Herrmann C, Schuler M, Rapp UR, Block C. Mitogenic signaling of Ras regulated by differential interaction with Raf isozymes. (2000) *Oncogene*, **19**:169-176.
- [34] Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, Terrell RS, Campbell-Burk S, Bell RM, Der CJ. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**:9809-9812.
- [35] Williams JG, Drugan JK, Yi GS, Clark GJ, Der CJ, Campbell SL. Elucidation of Binding Determinants and Functional Consequences of Ras/Raf\_Cysteine-rich Domain Interactions. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**:22172-22179.
- [36] Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. (2000) *Trends Cell Biol.*, **10**:147-154.
- [37] Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. (2001) *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**:1062-1074.
- [38] Ramirez De Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Lacal JC. Targeting new anticancer drugs within signaling pathways regulated by the Ras GTPase superfamily. (2001) *Int. J. Oncol.*, **19**:5-17.
- [39] Cohen LH, Pieterman E, van Leeuwen RE, Overhand M, Burm BE, van der Marel GA, van Boom JH. Inhibitors of prenylation of Ras and other G-proteins and their application as therapeutics. (2000) *Biochem. Pharmacol.*, **60**:1061-1068.
- [40] Prendergast GC. Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic mechanism and clinical aspects. (2000) *Cur. Op. Cell Biol.*, **12**:166-173.
- [41] McDonald OB, Chen Wj, Ellis B, Hoffman C, Overton L, Rink M, Smith A, Marshall CJ, Wood ER. A Scintillation Proximity Assay for the Raf/MEK/ERK Kinase Cascade: High-Troughput Screening and Identification of Selective Enzyme Inhibitors. (1999) *Anal. Biochem.*, **268**:318-329.
- [42] Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Tecle H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. (1999) *Nature Medicine*, **5**:810-816.
- [43] Herrmann, C, Block C, Geisen C, Haas C, Weber C, Winde G, Möröy T, Müller O. Sulindac sulfide inhibits Ras signalling. (1998) *Oncogene*, **17**:1769-1776.
- [44] Thompson HJ, Jiang C, Lu J, Metha RG, Piazza GA, Paranka NS, Pamukcu R, Ahnen DJ. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. (1997) *Cancer Res.*, **57**:267-271.
- [45] Pangas SA, Woodruff TK. Activin Signal Transduction Pathways. (2000) *Trends Endo. Metab.*, **11**:309-314.
- [46] Lewin B. (2000) *Genes VII*. 7. Auflage, 830-831, Verlag Oxford University Press.
- [47] Cárcamo J, Weis FMB, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massagué J. Typ I Receptors Specify Growth-Inhibitory and Transcriptional Responses to Transforming Growth Factor  $\beta$  and Activin. (1994) *Mol. Cell Biol.*, **14**:3810-3821.
- [48] Attisano L, Wrana JL. Mads and Smads in TGF $\beta$  signalling. (1998) *Curr. Op. Cell Biol.*, **10**:188-194.
- [49] Kretschmar M, Massagué J. SMADs: mediators and regulators of TGF- $\beta$  signalling. (1998) *Curr. Op. Gen. Devel.*, **8**:103-111.

- [50] Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific Interaction of Type I Receptors of the TGF- $\beta$  Family with the Immunophilin FKBP-12. (1994) *Science*, **265**:674-676.
- [51] Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK. The Immunophilin FKBP12 Functions as a Common Inhibitor of the TGF $\beta$  Family Type I Receptors. (1996) *Cell*, **86**:435-444.
- [52] Huse M, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J. Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF $\beta$  Receptor in Complex with FKBP12. (1999) *Cell*, **96**:425-436.
- [53] Kunz J, Hall MN. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. (1993) *Trends Biol. Sci.*, **18**:334-338.
- [54] Rossi FM, Blakely BT, Blau HM. Interaction blues: protein interactions monitored in live mammalian cells by beta-galactosidase complementation. (2000) *Trends Cell. Biol.*, **10**:119-122.
- [55] Van Aelst L. Two-hybrid analysis of Ras-Raf interactions. (1998) *Methods Mol. Biol.*, **84**:201-222.
- [56] Leanna CA, Hannink M. The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**:3341-3347.
- [57] Ge H. UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. (2000) *Nucleic Acid. Res.*, **28**:e3.
- [58] Pelletier JN, Campbell-Valois FX, Michnick SW. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:12141-12146.
- [59] Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. (1999) *Science*, **283**:990-993.
- [60] Jacobson RH, Zhang XJ, DuBose RF, Matthews. Three-dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. (1994) *Nature*, **369**:761-766.
- [61] Zeilstra-Ryalls JH, Somerville RL. Protein-protein interaction in the alpha-complementation system of beta-galactosidase. (1992) *Curr. Top. Cell. Regul.*, **33**:81-104.
- [62] Mohler WA, Blau HM. Gene expression and cell fusion analyzed by lacZ complementation in mammalian cells. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**:12423-12427.
- [63] Rossi F, Charlton CA, Blau HM. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**:8405-8410.
- [64] Rossi FM, Blakely BT, Charlton CA, Blau HM. Monitoring protein-protein interactions in live mammalian cells by beta-galactosidase complementation. (2000) *Methods Enzymol.*, **328**:231-251.
- [65] Blakely BT, Rossi FM, Tillotson B, Palmer M, Estelles A, Blau HM. Epidermal growth factor receptor dimerization monitored in live cells. (2000) *Nat Biotechnol.*, **18**:218-222.
- [66] Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. (1998) *Oncogene.*, **17**:3207-3213.
- [67] Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**:649-655.
- [68] Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. (1998) *Oncogene*, **17**:3237-3245.
- [69] Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**:388-393.
- [70] Schneider P, Tschoop J. Apoptosis induced by death receptors. (2000) *Pharm. Acta. Helv.* **74**:281-6.
- [71] Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. (1998) *Curr. Opin. Immunol.*, **10**:545-551.
- [72] Owen-Schaub L, Chan H, Cusack JC, Roth J, Hill LL. Fas and Fas ligand interactions in malignant disease. (2000) *Int. J. Oncol.*, **17**:5-12.
- [73] Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**:4961-4965.
- [74] Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**:1541-1548.

- [75] Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-Inhibitory Protein Splice Variants Inhibit Different Steps of Caspase-8 Activation at the CD95 Death-inducing Signaling Complex. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:20633-40.
- [76] Irisarri M, Plumas J, Bonnefoix T, Jacob MC, Roucard C, Pasquier MA, Sotto JJ, Lajmanovich A. Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line. (2000) *Leukemia*, **14**:2149-2158.
- [77] Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. (1998) *Oncogene* **17**:3261-70.
- [78] Tsao DH, McDonagh T, Telliez JB, Hsu S, Malakian K, Xu GY, Lin LL. Solution structure of N-TRADD and characterization of the interaction of N-TRADD and C-TRAF2, a key step in the TNFR1 signaling pathway. (2000) *Mol. Cell.*, **5**:1051-1057.
- [79] van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. (1998) *Trends Cell. Biol.*, **8**:107-111.
- [80] Abraham E. NF-kappaB activation. (2000) *Crit. Care. Med.*, **28**(4 Suppl):N100-104.
- [81] Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? (2000) *Trends Cell. Biol.*, **10**:129-133.
- [82] Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. (1999) *Oncogene*, **18**:6910-6924.
- [83] Reed JC. Bcl-2 family proteins. (1998) *Oncogene*, **17**:3225-3236.
- [84] Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**:68-75.
- [85] Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. (1997) *Science*, **275**:1132-1136.
- [86] Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D. Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:6939-42.
- [87] Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. (1999) *J. Cell. Biol.*, **144**:281-292.
- [88] Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. (1999) *Genes Dev.*, **13**:3179-3184.
- [89] Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**:11549-11556.
- [90] Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**:6067-6070.
- [91] Moriishi K, Huang DC, Cory S, Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:9683-9688.
- [92] Hengartner MO. The Biochemistry of Apoptosis. (2000) *Nature*, **407**:770-776.
- [93] Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**:414-419.
- [94] Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**:929-935.
- [95] Grad JM, Zeng XR, Boise LH. Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. (2000) *Curr. Opin. Oncol.*, **12**:543-549
- [96] Huang DC, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, Newton K, Tschopp J, Strasser A. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:14871-14876.
- [97] Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. (1999) *Oncogene*, **17**:3287-3299.
- [98] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. (2000) *Nature*, **408**:307-310.

- [99] Bennett MR. Mechanisms of p53-induced apoptosis. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **58**:1089-95.
- [100] Zhu J, Zhang S, Jiang J, Chen X. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**:39927-39934.
- [101] Caspari T. How to activate p53. (2000) *Curr. Biol.*, **10**:R315-317.
- [102] Mayo LD, Turchi JJ, Berberich SJ. Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. (1997) *Cancer Res.*, **57**:5013-5016.
- [103] Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**:14973-14977.
- [104] D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. (2002) *Nat. Cell. Biol.*, **4**:11-19.
- [105] Keller DM, Zeng X, Wang Y, Zhang QH, Kapoor M, Shu H, Goodman R, Lozano G, Zhao Y, Lu H. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. (2001) *Mol. Cell.*, **7**:283-292.
- [106] Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. (1999) *Oncogene*, **18**:6145-6157.
- [107] Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. (1999) *Curr. Opin. Oncol.*, **11**:68-75.
- [108] Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. (2000) *Carcinogenesis*, **21**:485-495.
- [109] Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:10983-10985.
- [110] Hutchinson J, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**:2203-2212.
- [111] Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tsichlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. (2001) *Am. J. Pathol.*, **159**:431-437.
- [112] Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. (2001) *FASEB J.*, **15**:1953-1962.
- [113] Liu X, Shi Y, Han EK, Chen Z, Rosenberg SH, Giranda VL, Luo Y, Ng SC. Downregulation of akt1 inhibits anchorage-independent cell growth and induces apoptosis in cancer. (2001) *Neoplasia*, **3**:278-286.
- [114] Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, Lin J. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. (2000) *Anticancer Res.*, **20**:407-416.
- [115] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. (1999) *Genes Dev.*, **13**:2905-2927.
- [116] Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. (2001) *Trends Biochem. Sci.*, **26**:657-664.
- [117] Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. (1998) *Biochem. J.*, **335**:1-13.
- [118] Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**:55-62.
- [119] Downward J. Lipid-regulated kinases: some common themes at last. (1998) *Science*. **279**:673-674.
- [120] Belham C, Wu S, Avruch J. Intracellular signalling: PDK1-a kinase at the hub of things. (1999) *Curr. Biol.*, **9**:R93-6.
- [121] Hill MM, Andjelkovic M, Brazil DP, Ferrari S, Fabbro D, Hemmings BA. Insulin-stimulated Protein Kinase B Phosphorylation on Ser-473 Is Independent of Its Activity and Occurs through a Staurosporine-insensitive Kinase. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**:25643-25646.
- [122] Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, Dedhar S. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:3207-3212.

- [123] Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**:27462-27469.
- [124] Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy JB, Chen H, Qiu Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**:31858-31862.
- [125] Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, Russo G, Tschlis P, Croce CM. Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**:3028-3033.
- [126] Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. (2000) *Cell*, **100**:387-390.
- [127] Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. (2001) *Exp. Cell. Res.*, **264**:29-41.
- [128] Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**:4240-4245.
- [129] Maira SM, Galetic I, Brazil DP, Kaech S, Ingley E, Thelen M, Hemmings BA. Carboxyl-Terminal Modulator Protein (CTMP), a Negative Regulator of PKB/Akt and v-Akt at the Plasma Membrane. (2001) *Science*, **294**:374-380.
- [130] Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. (1999) *Nature*, **401**:33-34.
- [131] Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser<sup>136</sup>. (1998) *Curr. Biol.*, **8**:779-782.
- [132] Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. (1997) *Cell*, **91**:231-241.
- [133] del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. (1997) *Science*, **278**:687-689.
- [134] Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**:32377-32379.
- [135] Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**:10761-10766.
- [136] Cardone MH, Roy N, Sennicke HR, Salvase GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. (1998) *Science*, **282**:4254-4245.
- [137] del Peso L, Gonzalez VM, Hernandez R, Barr FG, Nunez G. Regulation of the forkhead transcription factor FKHR, but not the PAX3-FKHR fusion protein, by the serine/threonine kinase Akt. (1999) *Oncogene*, **18**:7328-7333.
- [138] Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**:17179-17183.
- [139] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. (1999) *Cell*, **96**:857-868.
- [140] Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**:3534-3546.
- [141] Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. (1999) *Nature*, **401**:82-85.
- [142] Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. (1999) *Nature*. **401**:86-90.
- [143] Park HS, Kim MS, Huh SH, Park J, Kang SS, Choi EJ. Akt (Protein Kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. (2001) *J. Biol. Chem.*, epub ahead of print.
- [144] Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**:893-901.
- [145] Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S. Akt-Dependent Phosphorylation of p21(Cip1) Regulates PCNA Binding and Proliferation of Endothelial Cells. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**:5644-5657.

- [146] Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:11598-11603
- [147] Gold MR, Scheid MP, Santos L, Dang-Lawson M, Roth RA, Matsuuchi L, Duronio V, Krebs DL. The B cell antigen receptor activates the Akt (protein kinase B)/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway via phosphatidylinositol 3-kinase. (1999) *J. Immunol.*, **163**:1894-1905
- [148] Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**:29864-29872.
- [149] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. (1999) *Nature*, **399**:597-601.
- [150] Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**:262-267.
- [151] Mende I, Malstrom S, Tsichlis PN, Vogt PK, Aoki M. Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. (2001) *Oncogene*, **20**:4419-4423.
- [152] Zinda MJ, Johnson MA, Paul JD, Horn C, Konicek BW, Lu ZH, Sandusky G, Thomas JE, Neubauer BL, Lai MT, Graff JR. AKT-1, -2, and -3 are Expressed in Both Normal and Tumor Tissues of the Lung, Breast, Prostate, and Colon. (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**:2475-2479.
- [153] Gibbs JB. Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. (2000) *Science*, **287**:1969-1973.
- [154] Jun T, Gjoerup O, Roberts TM. Tangled Webs: Evidence of cross-talk between c-Raf-1 and Akt. (2000) *Signal transduction knowledge Environment / Science*, **13**:1-4.
- [155] Downward J. Ras signalling and apoptosis. (1998) *Curr. Op. Gen. Dev.*, **8**:49-54.
- [156] Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). (1999) *Science*, **286**:1741-1744.
- [157] Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. (1999) *Science*, **286**:1738-1741.
- [158] Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the Protein Kinase Raf-1 to Mitochondria. (1996) *Cell*, **87**:629-638
- [159] Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast RC Jr, Boyd D, Mills GB. Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*. 1999 Nov 18;18(48):6635-40.
- [160] Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms. (1999) *Science*, **286**:1358-1361.
- [161] Beaupre DM, Kurzrock R. RAS inhibitors in hematologic cancers: biologic considerations and clinical applications. (1999) *Invest. New Drugs*, **17**:137-143.
- [162] Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. (1997) *Cell*, **88**:435-437.
- [163] Resh MD. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. (1994) *Cell*. **76**:411-413.
- [164] Marinkovic DV, Marinkovic JN, Tang J. Fragments of beta-galactosidase from Escherichia coli. Fragmentation, purification, characterization and in vitro complementation. (1975) *Prep Biochem*. **5**:257-280.
- [165] Langley KE, Villarejo MR, Fowler AV, Zamenhof PJ, Zabin I. Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. (1975) *Proc Natl Acad Sci*. **72**:1254-1257.
- [166] Langley KE, Zabin I. beta-Galactosidase alpha complementation: properties of the complemented enzyme and mechanism of the complementation reaction. (1976) *Biochemistry*. **15**:4866-4875.
- [167] Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. (1994). *J. Cell. Biol.*, **124**:619-626.



- [168] Khwaja A, Rodriguez-Viciano P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. (1997). *EMBO J.*, **16**:2783-2793.
- [169] Ferreira CG, Span SW, Peters GJ, Kruyt FA, Giaccone G. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. (2000) *Cancer Res.* **60**:7133-7141.
- [170] Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. Apaf-1 Is a Transcriptional Target of p53 in DNA Damage-induced Apoptosis. *Cancer Res.*, **61**:6660-6664.
- [171] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JS. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. (1998) *Science*, **282**: 1318-1321.
- [172] Grothey A, Voigt W, Schober C, Muller T, Dempke W, Schmoll HJ. The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. (1999) *J Cancer Res Clin Oncol.*, **125**:166-173.
- [173] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. (2000) *Exp. Cell Res.*, **256**:42-49.
- [174] Micheau O, Hammann A, Solary E, Dimanche-Boitrel MT. STAT-1-Independent Upregulation of FADD and Procaspase-3 and -8 in Cancer Cells Treated with Cytotoxic Drugs. (1999) *Biol. Bioph. Res. Comm.* **256**:603-607.
- [175] Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. (1998) *Science* **282**:290-293.
- [176] Boland MP, Fitzgerald KA, O'Neill L. Topoisomerase II Is Required for Mitoxantrone to Signal Nuclear Factor  $\kappa$ B Activation in HL60 Cells. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:25231-25238.
- [177] Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- $\kappa$ B that blocks TNF $\alpha$ -induced apoptosis. (1999) *Genes Dev.* **13**:382-387.
- [178] Khwaja A, Tatton L. Resistance to the Cytotoxic Effects of Tumor Necrosis Factor alpha Can Be Overcome by Inhibition of a FADD/Caspase-dependent Signaling Pathway. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 36817-36823.
- [179] Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**:245-252.
- [180] Rodriguez-Fernandez JL. Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK? (1999) *Bioessays*, **21**:1069-1075.
- [181] Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler K, Vogelstein B. Role of BAX in the Apoptotic Response to Anticancer Agents. (2000) *Science*, **290**:989-992.
- [182] Sabbatini P, McCormick F. Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**:24263-24269.
- [183] Shoemaker RH. Genetic and Epigenetic Factors in Anticancer Drug Resistance. (2000) *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**:4-5.
- [184] LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. (1998) *Oncogene*, **17**:3247-3259.
- [185] Hatano E, Brenner DA. Akt protects mouse hepatocytes from TNF- $\alpha$ - and Fas-mediated apoptosis through NK- $\kappa$ B activation. (2001) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **281**:G1357-1368.
- [186] Charette SJ, Landry J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. (2000) *Ann. NY Acad. Sci.*, **926**:126-131.
- [187] Mahyar-Roemer M, Roemer K. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. (2001) *Oncogene*, **20**:3387-3398.
- [188] Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, Rijkse G, Makela TP, Medema RH. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**:30638-30643.
- [189] Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P, Serrano M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. (2001) *Cancer Res.*, **61**:6234-6238.

- [190] Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. (2000) *Nature*, **404**:782-787.
- [191] Clurman BE, Porter P. New insights into the tumor suppression function of P27(kip1). (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:15158-15160.
- [192] Yang HY, Shao R, Hung MC, Lee MH. P27 Kip1 inhibits HER2/neu-mediated cell growth and tumorigenesis. (2001) *Oncogene*, **20**:3695-3702.
- [193] Schmidt M, Lu Y, Parnant JM, Lozano G, Bacher G, Beckers T, Fan Z. Differential Roles of p21waf1 and p27kip1 in Modulating Chemosensitivity and Their Possible Application in Drug Discovery Studies. (2001) *Mol. Pharmacol.*, **60**:900-906.
- [194] Aoudjit F, Vuori K. Matrix Attachment Regulates Fas-induced Apoptosis in Endothelial Cells: A Role for c-Flip and Implications for Anoikis. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**:633-643.
- [195] Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. (1999) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **71**:435-478.
- [196] Bachelder RE, Wendt MA, Fujita N, Tsuruo T, Mercurio AM. The cleavage of Akt/PKB by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**:34702-34707.
- [197] Liu X, Shi Y, Han EK, Chen Z, Rosenberg SH, Giranda VL, Luo Y, Ng SC. Downregulation of akt1 inhibits anchorage-independent cell growth and induces apoptosis in cancer. (2001) *Neoplasia*, **3**:278-286.
- [198] Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? (1998) *Trends Cell Biol.*, **8**:267-271.
- [199] Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. (2001) *Nature*, **410**:549-554.
- [200] Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. (2000) *FEBS Lett.*, **476**:118-123.
- [201] Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. (2001) *Nature*. **409**:207-211.
- [202] Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. (1999) *FASEB J.*, **13**:1647-1657.
- [203] Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. (2000) *Cell*, **102**:849-862.
- [204] Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, **411**:349-354.
- [205] Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). (2001) *Science*, **292**:1728-1731.
- [206] Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**:38349-38352.
- [207] Leverrier Y, Thomas J, Mathieu AL, Low W, Blanquier B, Marvel J. Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. (1999) *Cell Death Differ.*, **6**:290-296.
- [208] Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossup P, Stein CA. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. (2000) *Cancer Res.*, **60**:6052-6060.
- [209] Micheau O, Solary E, Hammann A, Dimanche-Boitrel MT. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**:7987-7992.
- [210] Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzer R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. (2000) *Oncogene*, **19**:4563-4573.

- 
- [211] Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**:6893-6896.
- [212] Ferreira CG, Span SW, Peters GJ, Kruyt FA, Giaccone G. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. (2000) *Cancer Res.*, **60**:7133-7141.
- [213] Ding HF, Lin YL, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, Fisher DE. Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**:38905-38911.
- [214] Delhase M, LI N, Karin M. Kinase regulation in inflammatory response. (2000) *Nature*, **406**:367-368.
- [215] Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gelinas C, Fuchs EJ, Bedi A. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**:409-416.
- [216] Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**:7602-7612.



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

---

Name: Sascha Hövelmann  
Geburtsdatum: 22. August 1972  
Geburtsort: Frankfurt /Main  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulausbildung / Grundwehrdienst

---

August 1979 - Juli 1983 Freiligrath - Grundschule in Frankfurt / Main  
August 1983 - Juni 1992 Helmholtz - Gymnasium in Frankfurt / Main  
Allgemeine Hochschulreife - Notendurchschnitt: 1,0  
Dezember 1989 - August 1990 Auslandsschuljahr USA  
Central Cambria High School - Johnstown, Pennsylvania  
1. Juli 1992 - 30. September 1993 Grundwehrdienst beim Stabsmusikkorps der Bundeswehr  
- protokollarischer Ehrendienst in Bonn und Berlin / Konzertreisen -  
10. Januar 1994 Abschluß eines Fernstudiums „Französisch Vollehrgang“  
beim Institut für Lernsysteme in Hamburg

## Auslandserfahrung

---

Juli / August 1988 Teilnahme am 15. Simultanaustausch der deutschen mit der  
japanischen Sportjugend - Aufenthalt bei drei japanischen Familien  
Dezember 1989 - August 1990 Central Cambria High School - Johnstown, Pennsylvania, USA

## Studium

---

Oktober 1993 - Oktober 1995 Grundstudium Diplom-Chemie an der Johann-Wolfgang-Goethe  
Universität in Frankfurt / Main  
30. Oktober 1995 Diplomvorprüfung - Gesamturteil: „sehr gut“  
Oktober 1995 - Oktober 1998 Hauptstudium Diplom-Biochemie an der Johann-Wolfgang-Goethe  
Universität in Frankfurt / Main  
Februar / März 1998 Diplomhauptprüfung - Note: 1  
14. April - 14. Oktober 1998 Diplomarbeit - Note: 1  
Thema „Funktionelle Charakterisierung von sechs ortsspezifischen  
Mutanten aus der sechsten Transmembranhelix des Gonadotropin-  
Releasing-Hormon-Rezeptors“  
Betreuung: Prof. Michel und Prof. Fasold  
Durchführung: in den Labors der ASTA Medica AG Abteilung  
Tumorforschung/Molekularbiologie - Leitung Dr. Beckers  
14. Oktober 1998 Diplom-Biochemiker-Hauptprüfung - Gesamturteil „sehr gut“

## Promotion / Berufserfahrung

---

Januar 1999 - Februar 2002	Promotionsarbeit Thema „ <i>Entwicklung molekularer Testsysteme für die pharmazeutische Forschung: Inhibition des mitogenen Ras/Raf-Signalwegs und Validierung von PKB/Akt als potentielle Zielstruktur zur Therapie maligner Erkrankungen</i> “ Betreuung: Prof. Dingermann Durchführung: in den Labors der ASTA Medica AG Abteilung Tumorforschung/Molekularbiologie - Leitung Dr. Beckers
Seit 1. März 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der G2M Cancer Drugs AG, Frankfurt / Main

## Freiwillige wissenschaftliche Aktivitäten

---

Februar / März 1992	Teilnahme am Regional- und Landeswettbewerb „JUGEND FORSCHT - Themenbereich: Biologie“ - Verleihung eines Sonderpreises
Februar 1997	Praktikum am Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes in Homburg / Saar bei Prof. Richter Thema: „Die <i>Xenopus</i> -Oozyte als Expressionssystem“
Februar 1997	Praktikum am Max-Planck-Institut für Biophysik unter der Leitung von Prof. Fahrenholz mit Arbeiten am <i>Vasopressin</i> -Rezeptor
März - April 1997	Praktikum am Georg-Speyer-Haus in der Abteilung „Molekulare Virologie“ bei Dr. Dietrich und Dr. Unger mit Arbeiten im Bereich der HIV-Subtypisierung
Juli - September 1997	Praktikum bei ASTA Medica AG in der Abteilung Tumorforschung/Molekularbiologie unter der Leitung von Dr. Beckers und Dr. Hoffmann mit Arbeiten am <i>Gonadotropin-Releasing-Hormon</i> -Rezeptor

## Lehrtätigkeit

---

Juli - September 1997	Wissenschaftliche Hilfskraft am Gustav-Embden-Zentrum für Biologische Chemie der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt / Main
-----------------------	---

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

---

Hövelmann, S., Hoffmann, S.H., Kühne, R., ter Laak, T., Reiländer, H. und Beckers, T. (2002). „Impact of aromatic residues within transmembrane Helix 6 of the human Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor upon agonist and antagonist binding“, *Biochemistry*, **41**:1129-1136.

Schmidt, M., Hövelmann, S. und Beckers, T. (2002). „A novel form of constitutively active farnesylated Akt1 prevents mammary epithelial cells from anoikis and suppresses chemotherapy-induced apoptosis“, *British Journal of Cancer*, zur Publikation angenommen