

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Mitose assoziierter Zelltod nach Chemotherapie vermittelter Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Kontrollpunktes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Christian Hager

aus Lindlar

Marburg 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 16.7.2013.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Prof. Dr. Holger Bastians
1.Korreferent: Frau PD Dr. Jaques

Für Anne, Alicia, Jenny und Gerd

1 ZUSAMMENFASSUNG	5
ABSTRACT	6
2 EINLEITUNG	7
2.1 Eigenschaften von Tumorzellen	7
2.2 Der Zellzyklus	10
<i>Regulationsprinzipien des Zellzyklus</i>	10
<i>Mitose</i>	11
2.3 Zellzyklus-Kontrollpunkte.....	12
<i>Zellzyklus-Kontrollmechanismen in G1</i>	13
<i>Zellzyklus-Kontrollmechanismen in G2</i>	14
<i>Spindel-Kontrollpunkt</i>	16
2.4 Chemotherapie.....	19
<i>Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes</i>	20
2.5 Apoptose	23
Zielsetzung der Arbeit	28
3 MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 Material.....	29
3.2 Zellkultur	33
3.3 Biochemische Methoden	36
4 ERGEBNISSE	42
4.1 Zellzyklusverteilung nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung.....	42
4.2 Anreicherung mitotischer Zellen nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung	45
4.3 Inaktivierung des proapoptotischen Proteins Bax	48
4.4 Bcl-2-/Survivin-Expression nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung	49
4.5 Inhibierung von CDK1 nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung verstärkt den Zelltod	51
4.6 Verlust der Bcl-2-Phosphorylierung nach Inhibierung von CDK1	54
4.7 Weitere Signalwege mit Einflussmöglichkeiten auf einen Mitose-assoziierten Zelltod.....	55
5 DISKUSSION	58
Apoptotische und antiapoptotische Mechanismen nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung.....	58
Mechanismus der Einleitung des mitotischen Arrestes nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung	60
Bedeutung der Phosphorylierung von Bcl-2 nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung	63
Zunahme des Zelltodes durch Hemmung von CDK1 oder Aurora-B	66
Verzögerung des Mitoseeintrittes trotz UCN-01-Behandlung	67
Ausblick.....	69
6 LITERATURVERZEICHNIS	71
7 ANHANG	78
7.1 Abkürzungsverzeichnis	78
7.2 Danksagung	79
7.3 Akademische Lehrer.....	80

1 Zusammenfassung

Eine häufige Eigenschaft von Tumorzellen ist die Fehlfunktion von Signalwegen, die den Zellzyklus regulieren, wodurch eine erhöhte Proliferations- und Mutationsrate ermöglicht wird. Zellen mit einer gestörten Funktion des p53-abhängigen DNA-Schaden-Signalwegs in der G1-Phase besitzen einerseits diese Tumor-fördernden Eigenschaften und sind andererseits vollständig auf den DNA-Schaden-Signalweg der G2-Phase angewiesen, um schädlichen DNA-Schaden reparieren zu können. Ein neues Konzept einer kombinierten Chemotherapie besteht in der sequentiellen Gabe einer DNA-schädigenden Substanz und eines CHK1-Inhibitors, welcher den DNA-Schaden-Signalweg der G2-Phase hemmt. Zellen mit gestörter p53-Funktion können so weder in der G1- noch in der G2-Phase arretieren, um eine DNA-Reparatur zu ermöglichen, und versterben in großer Zahl nach Eintritt in die Mitose. Die hierbei eingeleiteten mitotischen und apoptotischen Signalwege sind bisher nicht im Detail bekannt und sollten in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

Ich konnte zeigen, dass in Zellen, die nach Behandlung mit Adriamycin (Topoisomerase-II-Hemmstoff) und UCN-01 (CHK1-Hemmstoff) mitotisch arretieren, neben der Einleitung einer mitochondrialen Apoptose auch antiapoptotische Signalwege aktiviert werden. So kommt es zu einer Abnahme der aktiven Form des proapoptotischen Proteins Bax und einer Hyperphosphorylierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Durch zusätzliche Gabe von Roscovitine (CDK1-Hemmstoff) kann der Zelltod deutlich verstärkt werden, was möglicherweise in einer direkten antiapoptotischen Funktion von CDK1 in der Mitose oder einer Entblockung apoptotischer Signale durch den mitotischen Austritt begründet ist. Eine ähnliche Therapieverstärkung zeigte sich nach einer Kombination mit dem Aurora-B-Inhibitor ZM447439. Diese Ergebnisse stützen den allgemeinen Ansatz, Tumorzellen mit DNA-Schaden in die Mitose zu treiben und einen hierdurch eingeleiteten Zelltod durch Interaktion mit mitotischen oder apoptotischen Proteinen zu verstärken.

Ob eine kombinierte sequentielle Chemotherapie aus DNA-Schädigung, CHK1-Inhibierung und CDK1-Inhibierung eine Option zur Effizienzsteigerung und Resistenzumgehung einer antiproliferativen Therapie darstellen könnte, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Niedermolekulare CHK1- und CDK1-Inhibitoren befinden sich als Einzelsubstanzen oder Kombinationstherapien in der klinischen Erprobung.

Abstract

Deficiency in cell cycle checkpoint function is a characteristic of tumour cells that enables to high proliferation and mutation rates. In particular, deficiency of p53-dependent signalling networks gives rise to such malignant traits while on the other hand making cells more dependent on the DNA damage recovery system in the G2-phase of the cell cycle to repair DNA damage. A new concept of combinational chemotherapy is the combination of a classical DNA damaging drug with an inhibitor of the CHK1-kinase, resulting in abrogation of the DNA damage recovery pathway in G2-phase. P53-deficient cells can therefore no longer arrest in G1 or G2 and enter mitosis with the introduced DNA damage, which leads to a mitotic arrest and high rates of cell death. The pathways linking DNA damage, mitotic arrest and apoptosis are not known in detail and are further studied in this work.

I showed that in cells, arrested in mitosis after treatment with Adriamycin and UCN-01, antiapoptotic pathways are activated, although mitochondrial apoptosis is induced. Under these conditions a reduction in the protein level of the active conformation of the proapoptotic protein bax and a hyperphosphorylation of the antiapoptotic protein Bcl-2 can be observed. Cell death is further enhanced by addition of the CDK1 inhibitor roscovitine, conceivably due to an antiapoptotic function of CDK1 in mitosis or an activation of apoptotic pathways triggered by mitotic exit. A similar effect can be seen by addition of ZM447439, a small molecule inhibitor of Aurora-B kinase.

Forcing cells with DNA damage into mitosis and manipulating activated mitotic and apoptotic pathways to enhance cell death, might therefore be a promising therapeutic strategy. Whether a combination treatment with a DNA damaging drug, a CHK1 inhibitor and a CDK1-inhibitor shows similar effects in other p53-deficient tumour cell lines and if it is tolerated by benign somatic tissues, should be tested in further experiments. Small molecule inhibitors of CHK1 and CDK1 are already in clinical trials as single treatment or in combination with various established chemotherapeutic agents.

2 Einleitung

2.1 Eigenschaften von Tumorzellen

Die Grundlage von Krebs ist die unkontrollierte Proliferation somatischer Zellen, die durch Verdrängung und Zerstörung anderer Gewebe in den meisten Fällen zum Tode führt. Entsprechend der Vielzahl menschlicher Gewebe, gibt es über hundert verschiedene Tumorarten. Die Einbindung tierischer Zellen in den Gewebeverband geht jedoch mit einer Vielzahl von inter- und intrazellulären Regulierungen einher, die eine Zelle durchbrechen muss, um ein autonomes Dasein führen zu können und sich ungehindert zu teilen. Ein weithin akzeptiertes Konzept der Tumorbiologie geht von sechs Eigenschaften, so genannten „Hallmarks“, aus, die Tumorzellen mindestens erlangen müssen, um vollständige Autonomie und Malignität zu erreichen (*HANAHAN et al. 2000*). Dies sind: (1) Lebensfähigkeit in Abwesenheit von Wachstumssignalen, (2) Resistenz gegenüber Wachstum hemmenden Signalen, (3) unbegrenzte Replikationsfähigkeit, (4) Resistenz gegenüber Apoptose, (5) Fähigkeit zur Neoangiogenese, (6) Fähigkeit zur Gewebeinvasion. Dabei können einerseits für die Erlangung einer Eigenschaft die Veränderungen mehrerer Gene/Proteine notwendig sein und andererseits kann die Veränderung in einem Schlüssel-Gen/-Protein, das an einem Knotenpunkt verschiedener Signalwege aktiv ist, zur Erlangung mehrerer Eigenschaften führen. Dieses Konzept verdeutlicht, dass die Tumorentwicklung ein mehrstufiger Prozess ist. Mehrere Mutationen müssen erfolgen, um Malignität zu erzeugen, was sich anschaulich in der Zunahme des Tumorrisikos mit dem Alter widerspiegelt.

Besonders Tumor-fördernd sind Veränderungen in Genen, die direkt Wachstum und Differenzierung betreffen. Gene deren Überaktivität Proliferation fördert, werden im physiologischen Zustand als Protoonkogene bezeichnet und nach einer Mutation, die ihre Aktivität erhöht, als Onkogene. Die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen auf der anderen Seite hemmen die Proliferation, wodurch eine inhibierende Mutation ebenfalls zur Erhöhung der Proliferationsrate führt.

Aus dem Modell der Tumorentstehung als mehrstufigem Prozess kann man ableiten, dass eine erhöhte Mutationsrate das Tumorrisiko vergrößern sollte, da sie die Anhäufung von Tumor-fördernden Mutationen beschleunigen kann. Genetische

Instabilität geht mit einer erhöhten Mutationsrate einher und ist daher eine häufig beobachtete Eigenschaft von Tumoren. Genetische Instabilität kann in zwei Klassen eingeteilt werden: Chromosomale Instabilität (CIN) und Mikrosatelliten-Instabilität (MIN). Bei der Mikrosatelliten-Instabilität sind Gene des „Mismatch Repair Systems“ (MMR) mutiert. Dieses System korrigiert nach der Replikation den Fehleinbau falscher Basen. Für MIN ist ein kausaler Zusammenhang mit der Krebsentstehung nachgewiesen und dieser ist für die Entstehung des erblichen nicht polypösen kolorektalen Karzinoms bedeutend (*STRATE et al. 2005*).

Chromosomale Instabilität beschreibt die Unfähigkeit einer Zelllinie, ihre Chromosomen während einer Zellteilung korrekt zu verteilen. Dies resultiert in unstablen Karyotypen mit veränderter Chromosomenzahl, ein Zustand, der als Aneuploidie bezeichnet wird.

Aneuploidie ist eine fast ubiquitäre Eigenschaft von Tumorzellen, deren leichte Diagnostizierbarkeit schon vor ca. 100 Jahren zu ihrer Entdeckung führte und mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht wurde (*WEAVER et al. 2006*). Es ist offensichtlich, dass Zu- oder Abnahme der Chromosomenzahl die Physiologie einer Zelle verändern kann. So wurde beobachtet, dass der Gewinn eines Chromosoms mit der Fehlregulation von 100-200 Genen einhergeht – von denen zudem ein großer Teil auf anderen Chromosomen liegt (*UPENDER et al. 2004*). Entsprechend drastischer werden die Veränderungen ausfallen, wenn der Karyotyp deutlich von der normalen Chromosomenzahl abweicht. Einerseits kann dies in einigen Fällen die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen verändern, andererseits können die Veränderungen der Zelle schaden und zum Zelltod führen. Bisher konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob Aneuploidie ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt ist oder ob sie nur für die Tumorprogression von Bedeutung ist bzw. vielleicht eine eher irrelevante Nebenerscheinung darstellt (*WEAVER et al. 2006*). Wahrscheinlich werden mit zunehmendem Verständnis über die Entstehung von Aneuploidie wichtige Erkenntnisse der Tumorentwicklung aufgedeckt. Die Signalwege, die diesbezüglich im Zentrum wissenschaftlichen Interesses stehen, sind der Spindel-„checkpoint“, die Zentrosomenregulation, die Spindeldynamik und die Faktoren, die das Anhaften der Schwester-Chromatiden gewährleisten (*HOLLAND et al. 2009*).

Die Suche nach spezifischen Tumoreigenschaften ist ein zentrales Anliegen der Onkologie, da solche theoretisch den Angriffspunkt für eine maßgeschneiderte Therapie darstellen, die nicht-transformierte Körperzellen verschont. In den seltenen

Fällen, in denen Onkogene durch Gentranslokation entstehen und zur Bildung von tumorspezifischen Hybrid-Proteinen führen, wurde diese Hoffnung bestätigt (*WEINSTEIN et al. 2008*). Zum Beispiel lässt sich durch Inhibierung der Tyrosinkinase Bcr-abl mit dem niedermolekularen Inhibitor Imatininib, die Tumorentwicklung bei der Leukämieform CML effektiv und nebenwirkungsarm bekämpfen (*DRUKER 2002*). Aber solche hochspezifischen Zielstrukturen sind die Ausnahme. Relativ spezifische Eigenschaften stellen tumorspezifische Expressionsveränderungen mancher Proteine wie p53 und Survivin dar, auf deren Grundlage aber bisher trotz zahlreicher Ansätze noch keine Therapie mit deutlichem klinischen Erfolg entwickelt werden konnte (*DEY et al. 2008*).

Eine weitere spezifische Eigenschaft vieler Tumoren ist die Fehlregulation von Signalwegen, die den Zellzyklus kontrollieren. Aufgrund äußerer und innerer Stressfaktoren wie DNA-Schaden, Replikationsfehlern, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Fehlern in der Mitose, können diese Signalwege den Zellzyklus an definierten Kontrollpunkten anhalten, um der Zelle eine Beseitigung der potentiell schädlichen Bedingungen zu ermöglichen. Defiziente Zellzyklus-Kontrollpunkte können in Tumorzellen zu einer erhöhten Proliferationsrate, genetischer Instabilität und im Falle eines defizienten Mitose-Kontrollpunktes zu Aneuploidie führen. Andererseits sind diese Zellen umso mehr auf die verbleibenden Kontrollpunkte angewiesen, um bei Stressoren wie DNA-Schaden geeignete Reparaturmechanismen einzuleiten. Eine gezielte chemische Manipulation („targeted therapy“) der verbleibenden Zellzyklus-Kontrollpunkte kann zum selektiven Zelltod solcher Tumorzellen unter Verschonung gesunder Zellen mit multiplen intakten Zellzyklus-Kontrollpunkten führen (*GABRIELLI et al. 2012*). Es gibt Hinweise dafür, dass in Kombination mit einer klassischen antiproliferativen Therapie wie DNA-toxischen Substanzen, Strahlentherapie oder Spindelinhhibitoren, so eine höhere Therapieeffizienz erreicht und Resistenz umgangen werden können („combinational therapy“) (*DEEP et al. 2008*).

2.2 Der Zellzyklus

Regulationsprinzipien des Zellzyklus

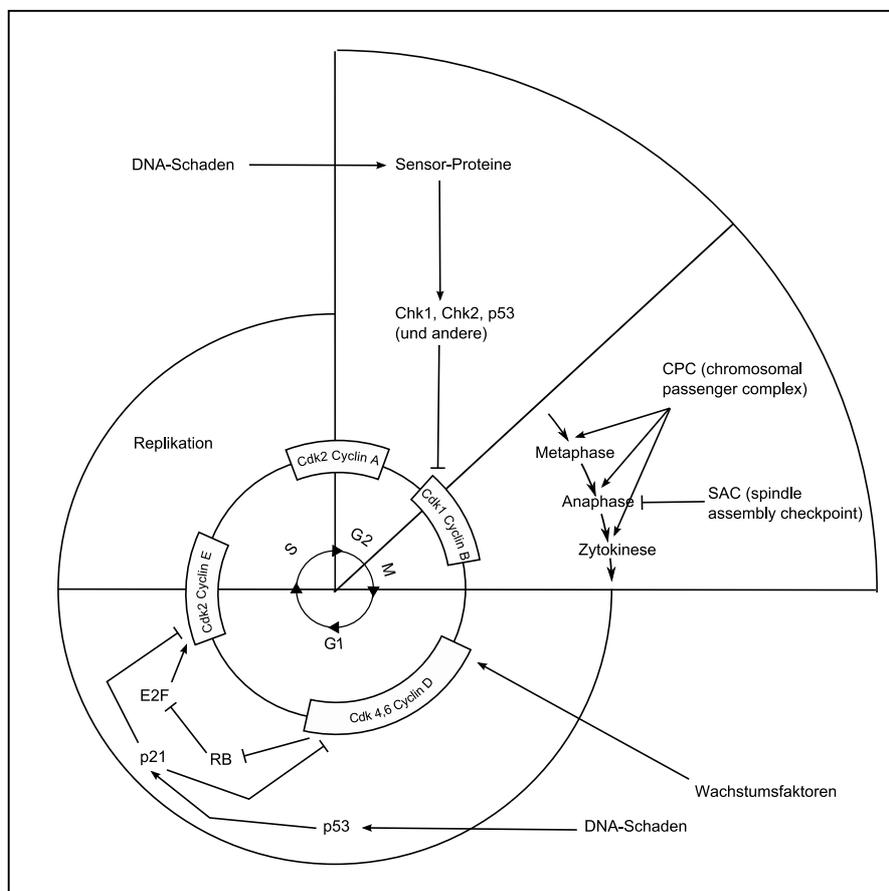


Abb. 2.1: Grafik des Zellzyklus mit Zyklusphasen, Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und grundlegenden Kontrollpunkt-Signalwegen. Die Abschnitte von M-Phase und G2-Phase sind vergrößert dargestellt, um Einzelheiten der Signalwege darstellen zu können. Zentrale Regulatoren des Fortschreitens des Zellzyklus sind die CDKs und Cycline. Signalwege, die DNA-Schaden detektieren und als Reaktion das Fortschreiten des Zellzyklus stoppen können, sind vor allem in G1 und vor Eintritt in die Mitose in G2 aktiv. Schlüsselproteine dieser Signalwege sind p53, p21, Chk1 und Chk2. Für den komplexen, fein abgestimmten Ablauf mitotischer Prozesse sind Proteinkomplexe wie der Spindelkontrollpunkt (SAC „spindle assembly checkpoint“) und der CPC („chromosomal passenger complex“) wichtig.

Zellen vermehren sich durch Zellteilung, bei der aus einer Zelle zwei identische Tochterzellen mit gleichem DNA-Gehalt generiert werden. Die zellulären Prozesse zwischen zwei Zellteilungen werden als Zellzyklus bezeichnet und lassen sich in verschiedene Abschnitte einteilen. Große Veränderungen der Zellstruktur finden hierbei in der S-Phase und M-Phase statt. In der S-Phase (S für „synthesis“) erfolgt im Rahmen der Replikation die sorgfältige Duplizierung der gesamten chromosomalen DNA. In der M-Phase (M für „mitosis“) kondensieren die Chromosomen, werden nach Auflösung der Kernmembran am mitotischen Spindelapparat befestigt und es kommt

zur Zellteilung. Die dazwischen liegende G1- und G2-Phase (G für „gap phase“) wird jeweils genutzt, um für die nächsten Schritte wichtige Proteine zu bilden, Zellorganellen zu duplizieren und auf Gefahren und Fehler, wie beispielsweise DNA-Schaden, der durch äußere Faktoren oder im Rahmen der S-Phase entstanden sein kann, reagieren zu können.

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und die zyklische Expression so genannter Cycline reguliert. Die CDKs werden erst nach Bindung an ein Cyclin aktiv und können dann hunderte verschiedener Substrate, darunter auch Transkriptionsfaktoren, phosphorylieren. Mit Anstieg des Cyclinspiegels wird somit ein für den nächsten Zyklusschritt typisches Phosphorylierungs- und Genexpressionsmuster eingeleitet. In jeder eukaryotischen Zelle existieren verschiedene CDKs und Cycline, wobei jeweils eine bestimmte CDK/Cyclin-Kombination einem definierten Zyklusschritt zugeordnet ist: CDK4/Cyclin-D sowie CDK2/Cyclin-E sind in der G1-Phase aktiv und bereiten die S-Phase vor, CDK2/Cyclin-A reguliert die Einleitung der DNA-Replikation und CDK1/Cyclin-B ist für die Einleitung und Durchführung der Mitose zuständig (*SANCHEZ et al. 2005*). Die Cyclin-Spiegel werden durch Proteinsynthese und proteasomalen Abbau reguliert. Weitere Regulationsebenen der CDKs stellen die Bindung an CDK-inhibierende Proteine („CDK inhibitory proteins“ = CKIs) wie p21 und p27 sowie aktivierende und inhibierende Phosphorylierungsstellen an den CDKs selbst dar. Diese Regulationsebenen ermöglichen verschiedenen Kontrollmechanismen des Zellzyklus das Fortschreiten des Zyklus auf die durchgeführten Prozesse und das Umfeld der Zelle abzustimmen und die Einleitung des nächsten Schrittes gegebenenfalls zu verzögern.

Mitose

In der Mitose finden die umfangreichsten Veränderungen innerhalb des Zellzyklus statt. Die Chromosomen kondensieren, die Kernmembran löst sich auf, ein Spindelapparat aus Mikrotubuli wird aufgebaut, um sich mit den Chromosomen zu verbinden, und schließlich werden diese getrennt, gefolgt von einer Einschnürung der Zellmembran, die das Zytoplasma teilt.

Die Mitose wird in verschiedene Phasen eingeteilt. In der Prophase kondensieren die Chromosomen und, von den Zentrosomen ausgehend, bildet sich der Spindelapparat aus. In der Mitte der Chromosomen, in der so genannten Zentromer-Region, bildet sich

ein großer Proteinkomplex aus, der als Kinetochor bezeichnet wird. Mit dem Zusammenbruch der Kernmembran beginnt die Prometaphase, in der erste Interaktionen zwischen Spindelmikrotubuli und Kinetochoren möglich sind und die Chromosomen demzufolge erste Bewegungen zeigen. In der Metaphase sind die Chromosomen fast vollständig in der Mitte zwischen den Spindelpolen aufgereiht. Die Trennung der Chromosomenpaare und das gleichzeitige Auseinanderweichen der Zentrosomen kennzeichnen die Anaphase. In der Telophase beginnt die Bildung des kontraktilen Ringes für die Teilung des Zytoplasmas und um die Chromosomen an den Spindelpolen bilden sich wieder Bruchstücke einer Kernmembran. Schließlich wird im Rahmen der Zytokinese die Teilung des Zytoplasmas durch Kontraktion der Aktin- und Myosinfilamente im kontraktilen Ring abgeschlossen. Wichtige Signalwege in der Mitose sind der Spindel-Kontrollpunkt, der den sensiblen Prozess der Trennung der Chromosomenpaare überwacht, und der so genannte „chromosomal passenger complex“, der verschiedene Aufgaben bei der Spindelbildung, Chromosomenverteilung, Zentromer-Kohesion und Zytokinese inne hat (*RUCHAUD et al. 2007*). Im Mittelpunkt der mitotischen Prozesse steht der Komplex aus CDK1 und Cyclin-B, der die Mitose einleitet und reguliert.

2.3 Zellzyklus-Kontrollpunkte

Ein fehlerhafter Ablauf der Zellzyklusphasen und insbesondere eine fehlerhafte Replikation der DNA können zu zellulärem Funktionsverlust, Zelltod, ungebremster Proliferation und maligner Entartung führen. Das fein regulierte Aufeinanderfolgen der einzelnen Schritte des Zellzyklus und eine Unterbrechung des Ablaufs bei DNA-Schaden werden durch inhibierende Signalketten gewährleistet. Vergleichbar einem Kontrollpunkt („Checkpoint“), arretiert das durch einen zellulären Stressfaktor ausgelöste hemmende Signal den Zyklus (Zellzyklus-Arrest) und lässt ihn erst fortschreiten, wenn alle Bedingungen für einen gefahrlosen Ablauf der folgenden Phasen erfüllt sind. Beispiele für solche Kontrollpunkt-Mechanismen sind die Zellzyklus-Kontrollpunkte in G1 und G2, die insbesondere bei DNA-Schaden aktiviert werden, sowie der Spindel-Kontrollpunkt, der bei fehlerhaftem Ablauf der Mitose aktiviert wird.

Zellzyklus-Kontrollmechanismen in G1

Der Zellzyklus-Kontrollpunkt in G1 kann den Eintritt in die S-Phase blockieren. Im Mittelpunkt der Regulation der S-Phasen-Einleitung steht der Transkriptionsfaktor E2F, der die Synthese von für die S-Phase wichtigen Proteinen wie Cyclin-A, Thymidylat-Synthase und Dihydrofolat-Reduktase steuert. E2F wird von dem Protein RB gebunden und inhibiert. Erst die sequentielle Multi-Phosphorylierung von RB führt zur Dissoziation der beiden Proteine und erlaubt E2F die S-Phase zu starten. Die Phosphorylierung von RB wird durch Cyclin-D/CDK4 eingeleitet, wodurch die Transkription von Cyclin-E ermöglicht wird, welches mit CDK2 zur vollständigen Phosphorylierung von RB beiträgt (*MASSAGUE 2004*). Inhibierende Mutationen im RB-Gen können zu E2F-Überaktivität und dadurch ungehinderter Proliferation führen und sind für die Entstehung des Retinoblastoms bedeutsam (*CLASSON et al. 2002*), in dem RB-Mutationen erstmals identifiziert wurden.

Der Transkriptionsfaktor p53 stellt eine wichtige zusätzliche Regulationsebene zu dem E2F/RB-abhängigen Eintritt in die S-Phase dar. Er blockiert den Eintritt bei Vorliegen von DNA-Schaden bis die Reparatur abgeschlossen ist. Der Mechanismus dieser Blockade basiert auf der Induktion des CDK-Inhibitors p21, der sowohl Cyclin-D/CDK4 als auch Cyclin-E/CDK2 inhibieren kann und somit die Phosphorylierung von RB effektiv verhindert (*LEVINE 1997*). Unter physiologischen Bedingungen ist p53 in Zellen kaum nachweisbar und wird durch das Protein Mdm2 gehemmt, welches einerseits die Transkriptionsfunktion von p53 blockiert und andererseits durch eine Ubiquitinligasefunktion den proteasomalen Abbau von p53 einleitet (*KLEIN et al. 2004*). Als Reaktion auf verschiedene Stressoren, wie z.B. DNA-Schaden, kann p53 schnell durch spezifische Phosphorylierungen aktiviert werden. Störungen in den Signalwegen, die durch RB und p53 kontrolliert werden, sind zentral für die Entstehung von Krebs.

Im Zentrum der zellulären Reaktionen auf DNA-Schaden stehen die Kinasen ATM und ATR. Sensor-Proteinkomplexe wie der 9-1-1-Komplex und ein Komplex aus der Kinase ATR und dem Protein ATRIP (ATR-interacting protein) erkennen beschädigte DNA-Strukturen und lagern sich ihnen an. Mediator-Proteine wie MDC1, 53BP1 und BRCA1 unterstützen die Kinasen ATM und ATR bei der Signaltransduktion (*KASTAN et al. 2004*). Wichtige Substrate von ATM/ATR sind die Effektorkinasen CHK1 und

CHK2, die unter anderem für die Signalvermittlung zur Arretierung des Zellzyklus gebraucht werden (*STRACKER et al. 2009*).

Bei DNA-Schaden in der G1-Phase wird der Transkriptionsfaktor p53 durch die Kinasen ATM/ATR an Ser15 sowie an weiteren Phosphorylierungsstellen durch CHK1/CHK2 phosphoryliert, was zu seiner Stabilisierung und erhöhten Aktivität führt. Durch Induktion von p21, welches CyclinE/CDK2 inhibiert, wird dann ein p53-abhängiger G1-Zellzyklus-Arrest (G1-Arrest) eingeleitet (*KASTAN et al. 2004*).

Bei Nicht-Behebung des Schadens kann p53-abhängig Apoptose eingeleitet werden. Die Apoptoseregulation durch p53 erfolgt über die Transkription proapoptotischer Proteine wie Fas, Bax, Bak und Puma sowie durch direkte Aktivierung proapoptotischer Proteine wie Bax und Inhibierung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 an der Mitochondrienmembran (*CHIPUK et al. 2004*).

Die Bedeutung von p53 für die Behebung von DNA-Schaden wird durch Situationen verdeutlicht, die durch eine Fehlfunktion des Proteins gekennzeichnet sind. Die Mutation des *P53*-Tumorsupressorgens in der Keimbahn ist die Ursache für das Li-Fraumeni-Syndrom, welches durch ein erhöhtes Krebsrisiko für verschiedene Tumoren wie Brustkrebs, Hirntumoren und Leukämien gekennzeichnet ist (*NICHOLS et al. 2001*). Das Protein E6 humaner Papilloma-Viren entfaltet sein onkogenes Potential durch Hemmung der Funktion von p53 (*SCHEFFNER et al. 1990*). Protein E6 wird auch von der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa exprimiert, in welcher die p53-Kontrollmechanismen weitgehend ausgeschaltet sind. Diese Zellen können nach DNA-Schädigung in der G1-Phase in der Regel nicht mehr arretiert werden und sind zur Reparatur ihrer DNA vermehrt auf den G2-Kontrollpunkt angewiesen (*CHEN et al. 2003*).

Zellzyklus-Kontrollmechanismen in G2

Der G2-Kontrollpunkt dient der Arretierung des Zellzyklus und der Verhinderung des Eintritts in die Mitose bei Vorliegen von DNA-Schaden, der beispielsweise durch Fehler bei der Replikation entstanden ist. Er gibt der Zelle Zeit für die Reparatur der bestehenden Schäden. Für eine Arretierung des Zellzyklus vor Eintritt in die Mitose ist die Blockierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes essentiell.

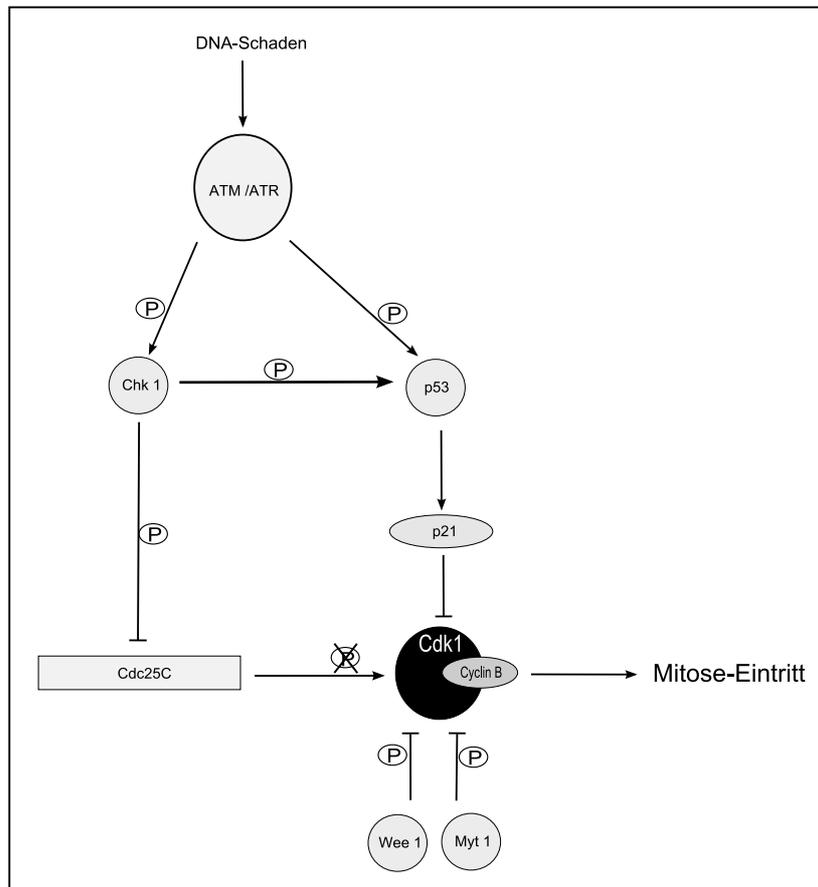


Abb. 2.2: Aktivierung des G2-„Checkpoints“ nach DNA-Schaden mit Darstellung einiger wichtiger Proteine dieses Signalweges sowie deren Interaktionsmechanismen. Im Mittelpunkt steht hierbei die Blockade der CDK1-Aktivierung. CDK1 wird durch Phosphorylierungen, unter anderem von den Kinasen Wee1 und Myt1, inaktiv gehalten und kann durch die Phosphatase Cdc25C dephosphoryliert und damit aktiviert werden. DNA-Schaden-Signalwege können die Aktivierung von CDK1 direkt über das CKI p21 oder indirekt über die Hemmung der Phosphatase Cdc25C verhindern. Bei Funktionsverlust von p53 ist hierfür die Signaltransduktion über die Kinase CHK1 essentiell.

In der G2-Phase steigen die Cyclin-B-Spiegel an und die Einleitung der Mitose ist vor allem vom Aktivitätszustand der Kinase CDK1 abhängig. CDK1 wird durch inhibierende Phosphorylierungen inaktiv gehalten und kann durch die Phosphatase Cdc25C dephosphoryliert und damit aktiviert werden. Die hemmenden Phosphorylierungen an CDK1 können von den Kinasen Myt1 und Wee1 vermittelt werden, die konstitutiv aktiv sind, und zusätzlich durch verschiedene Mechanismen in ihrer Aktivität verstärkt werden. Für die Aktivierung von Cyclin-B/CDK1 ist die Balance zwischen den phosphorylierenden Inhibitoren Myt1/Wee1 und dem dephosphorylierenden Aktivator Cdc25C ausschlaggebend (*DONZELLI et al. 2003*).

DNA-Schaden kann die Aktivierung von CDK1 auf mindestens zwei parallelen Wegen verhindern. Zum einen über den auch in G1 aktiven inhibitorischen Signalweg, der auf p53 und dem CKI p21 basiert, welches sowohl CDK4/CDK2 in G1 wie auch CDK1 in G2 inhibieren kann, zum anderen über Inaktivierung der Phosphatase Cdc25C in G2.

Hierzu wird ein Signal von den DNA-Schaden-Sensoren über ATM/ATR an die Kinasen CHK1/CHK2 weitergeleitet, die Cdc25C phosphorylieren und damit eine Bindungsstelle für das Protein 14-3-3 schaffen. 14-3-3 transportiert die Phosphatase aus dem Nukleus ins Zytoplasma, wo ihr Abbau erfolgt (*KASTAN et al. 2004*).

In Zellen mit gestörter p53-Funktion kann nur noch der CHK1-abhängige Signalweg in der G2-Phase genutzt werden, um auf DNA-Schaden zu reagieren. So kann ein G2-Zellzyklus-Arrest (G2-Arrest) nach Behandlung durch den Topoisomerase-II-Hemmstoff Adriamycin bereits durch Störung der CHK1-Funktion allein durchbrochen werden (*HO et al. 2005*).

Spindel-Kontrollpunkt

Eine Fehlverteilung der Chromosomen während der Mitose kann zu Aneuploidie, abweichenden Karyotypen und zur Entstehung fehlregulierter, nicht lebensfähiger oder neoplastischer Tochterzellen führen. Die sorgfältige Anbringung der Chromatidenpaare an der mitotischen Spindel in der Metaphase und die darauf folgende Trennung der Chromatidenpaare in der Anaphase müssen daher fein aufeinander abgestimmt sein. Der „spindle assembly checkpoint“ (SAC) überwacht diesen sensiblen Prozess, indem er gewährleistet, dass die Trennung der Chromatidenpaare erst einsetzt, wenn alle Chromatidenpaare beidseits an den Spindelpolen angebracht sind und durch Zug der Spindelmikrotubuli zu den Polen unter Spannung stehen. Ein einziges nicht verbundenes Kinetochor reicht aus, um die Trennung aller Chromatidenpaare zu blockieren (*RIEDER et al. 1995*).

Hierzu lagern sich für den Spindel-Kontrollpunkt wichtige Proteine wie Mad1, Mad2, Bub1, Bub3, BubR1 und Mps1 an unverbundene oder falsch verbundene Kinetochoren an und generieren, auf noch nicht ganz geklärte Weise, ein inhibitorisches Signal, das die Einleitung der Anaphase verhindert. Die Proteine der Mad- („mitotic arrest deficient“) und Bub-Familie („budding uninhibited by benzimidazole“) sind in allen eukaryotischen Zellen konserviert und wurden Anfang 1990 in Screening-Untersuchungen an Hefen entdeckt, bei denen getestet wurde, welche Mutationen zu einem Verlust der Spindel-Kontrollpunkt-Funktion führen.

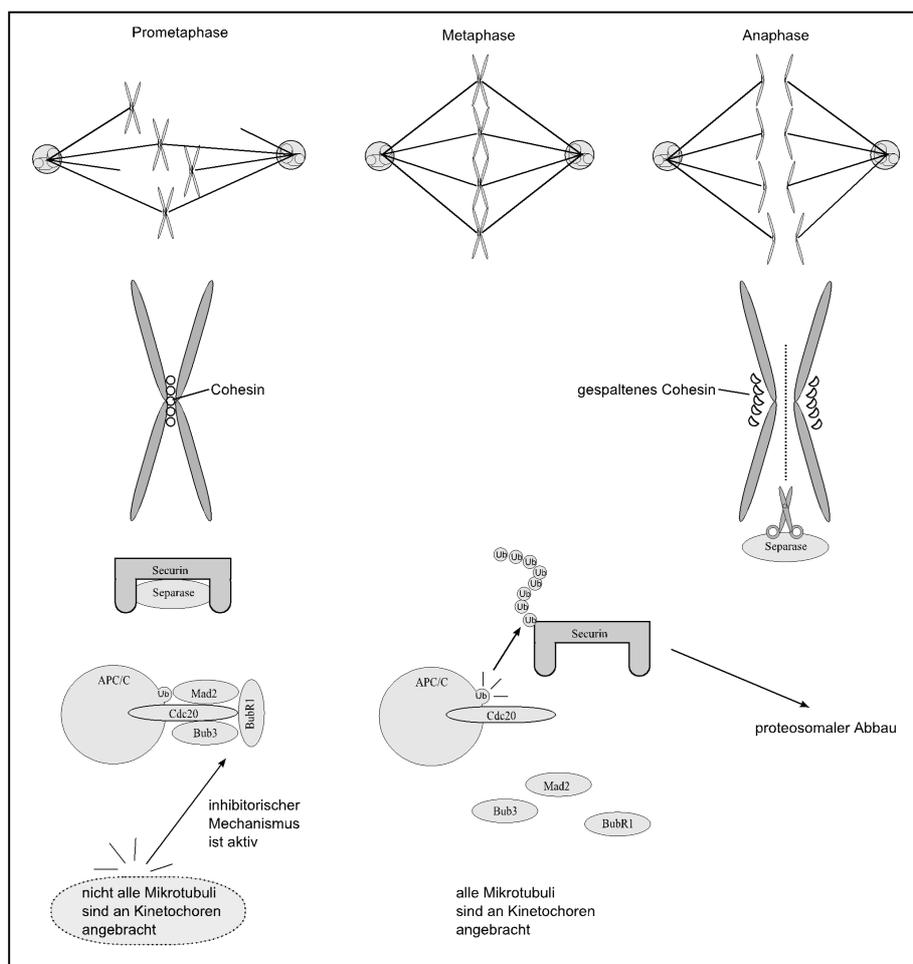


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Spindel-Kontrollpunktes. Dieser gewährleistet, dass alle Chromosomenpaare beidseits am Spindelapparat angebracht sind, bevor die Anaphase eingeleitet wird. Ein fehlender Kontakt zwischen Kinetochor und Mikrotubuli an einem der Chromosomenpaare unterhält einen inhibitorischen Mechanismus, der die Ubiquitinligase APC/C hemmt, wodurch die Cohesin-spaltende Separase inaktiv gehalten wird. Sind alle Chromosomenpaare bipolar verbunden, geben die SAC („spindle assembly checkpoint“-) Proteine den Kofaktor Cdc20 frei und die Ubiquitin-Ligase APC/C markiert Securin zum proteasomalen Abbau, was zur Aktivierung von Separase und zur Trennung der Chromatidenpaare führt.

Das inhibitorische Signal stört die Interaktion des Proteins Cdc20 mit der Ubiquitin-Ligase APC/C (anaphase promoting complex/ cyclosome). Sind alle Chromatidenpaare richtig an der mitotischen Spindel angebracht, kann der aktive APC/C-Cdc20-Komplex das Protein Securin ubiquitinieren und dem proteasomalen Abbau zuführen, wodurch die, sonst durch Securin inhibierte, Cystein-Protease Separase aktiv wird. Separase leitet die Spaltung des die Chromatidenpaare verbindenden Cohesins und damit deren Trennung im Rahmen der Anaphase ein (NASMYTH et al. 2000). Zusätzlich leitet der aktive APC/C-Cdc20-Komplex den proteasomalen Abbau von Cyclin-B ein und führt somit zur Inaktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes, was zum Austritt aus der Mitose beiträgt.

Ungeklärt ist bisher der genaue Mechanismus, wie die Spindel-Kontrollpunkt-Proteine mit Cdc20 interagieren. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei Mad2, als direktem Interaktionspartner von Cdc20 sowie einem Komplex aus Mad2, Bub3, BubR1 und Cdc20 (MCC-Komplex = „mitotic checkpoint complex“) zu. Neben den Proteinen der Mad- und Bub-Familie sind in menschlichen Zellen zahlreiche weitere Proteine wie die Kinetochorkomponente Ndc80, das Motorprotein CENP-E, mitotische Kinasen wie CDK1, Plk1 und Aurora-B sowie der so genannte „Chromosomal passenger complex“ an der Signalübertragung des Spindel-Kontrollpunktes beteiligt.

Der „Chromosomal passenger complex“ (CPC) hat eine besondere Bedeutung für die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes in Situationen, in denen zwar Mikrotubuli mit den Kinetochoren in Kontakt sind, jedoch nicht unter Spannung stehen. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die zwei Kinetochoren eines Chromatidenpaares mit Mikrotubuli desselben Spindelpols verbunden sind („monotelic attachment“). Diese Situation würde in der Anaphase zu einer Fehlverteilung des genetischen Materials führen. Der CPC, der sich aus den vier Proteinen Aurora-B, Survivin, INCENP und Borealin zusammensetzt, kann solche falschen Verbindungen erkennen und lösen. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Kinase Aurora-B, die an der Kinetochor-Mikrotubuli-Schnittstelle verschiedene Substrate phosphorylieren und damit die Stabilität der Verbindung modulieren kann. Survivin und INCENP sind u.a. für die richtige Lokalisierung des Komplexes zuständig (*VADER et al. 2008*). Ob Aurora-B indirekt durch die Destabilisierung der Kinetochor-Mikrotubuli-Verbindung und damit durch die Entstehung eines freien Kinetochors den Spindelkontrollpunkt aktiviert oder direkt an der Signalkaskade beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Forschung (*BECKER et al. 2010*).

2.4 Chemotherapie

Eine gemeinsame Eigenschaft aller Tumoren ist ihre hohe Proliferationsrate. Da für die meisten Tumorerkrankungen kein spezifischer Therapieansatz besteht, basiert der Großteil chemotherapeutischer Schemata auf der antiproliferativen Therapie. DNA-schädigende Stoffe und Antimetabolite auf der einen Seite, und Mitose-attackierende Stoffe wie *Vinca*-Alkaloide und Taxane auf der anderen Seite, bilden daher seit Einführung der Chemotherapie in den 1940er Jahren deren klassische Vertreter (*CHABNER et al. 2005*). Unerwünschte Wirkungen dieser antiproliferativen Therapie sind vor allem das Absterben gesunder proliferierender Gewebe – mit Haarausfall, Gastroenteritiden, Ulcera, Myelosuppression und Anämie als Folgen – sowie langfristig Sekundär-Tumor-Entstehung durch zugefügten DNA-Schaden. Hinzu kommen bei den so genannten Spindelgiften häufig Schäden an nicht proliferierenden Zellen, die zum Beispiel als Neuropathien zum Ausdruck kommen.

Neben den unerwünschten Wirkungen dieser Stoffe, stellen Resistenzen ein großes Problem dar. Die hohe Mutationsrate der Tumoren begünstigt die Entstehung von resistenten Subklonen, die der Wirkung des jeweiligen Chemotherapeutikums entkommen können. Aus diesem Grund werden oft verschiedene Substanzklassen im Therapieschema kombiniert, um das Auftreten solcher Resistenzen zu minimieren.

Trotz dem schon über 50-jährigen Einsatz antiproliferativer Substanzklassen wurden erst in den letzten Jahren wichtige Prinzipien in ihrem Wirkmechanismus entdeckt. Es wurde beobachtet, dass die zugefügten Schäden eine Vielzahl zelleigener Signalwege initiieren, die - sehr viel koordinierter als vorher angenommen - Prozesse wie Apoptose auslösen (*KIM et al. 2002*). Veränderungen in diesen Signalwegen können zu einem Nicht-Ansprechen des Tumors führen (*LEE et al. 2003*). Zu diesen, für den Erfolg klassischer antiproliferativer Therapien wichtigen, Signalwegen gehören Apoptosemechanismen, Reparaturmechanismen von DNA-Schaden und Signalwege der Zellzyklus-Kontrollpunkte. Die Interaktionen dieser Netzwerke aufzudecken ist essentiell für das Verständnis der heute weit verbreiteten Chemotherapieformen und deren Verbesserung (*CLARKE et al. 2009*).

Da spezifischere Eigenschaften von Tumorzellen als deren Proliferationsrate bisher noch nicht in großem Maße in klinisch erfolgreiche Anwendungen umgesetzt werden konnten, wird Mitose- und DNA-angreifenden Stoffen weiterhin eine zentrale Rolle im

Therapieplan zukommen. Möglichkeiten zu finden ihre Wirksamkeit zu verbessern, die Sensibilität von Tumorzellen zu erhöhen, Nebenwirkungen zu vermindern und Resistenzen zu umgehen, ist daher ein viel versprechender Ansatz für zukünftige therapeutische Entwicklungen.

Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes

Die Schädigung der DNA durch Bestrahlung oder Chemotherapie, als therapeutisches Prinzip, gehört zu den häufigsten Formen der Tumorthherapie, dessen Anwendung zu signifikanter Verlängerung der Lebenszeit von Tumorpatienten geführt hat. Problematisch sind eine hohe Toxizität dieser allgemein antiproliferativen Therapien und das Auftreten von Resistenzen. Daher wird neben der Entwicklung von effizienteren und nebenwirkungsärmeren Substanzklassen (*HURLEY 2002*) auch kontinuierlich nach Möglichkeiten gesucht, speziell Tumorzellen für eine solche Therapie zu sensibilisieren, um den therapeutischen Index zu erhöhen sowie Resistenzen zu umgehen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde Ende der 60er Jahre beobachtet, dass resistente Zellen durch Caffein wieder sensibilisiert werden können (*GAUDIN et al. 1969*). Ein Jahrzehnt später wurde berichtet, dass dieser Effekt auf einer Verhinderung des G2-Zellzyklus-Kontrollpunktes und der Einleitung einer fehlerhaften Mitose beruht (*LAU et al. 1982*). Der genaue Mechanismus des Effektes konnte jedoch nicht verstanden werden, da grundlegende Prinzipien der Zell- und Tumorbologie noch nicht entdeckt worden waren. Erst Ende der 80er Jahre wurden die Prinzipien des Zellzyklus und seiner Kontrollpunkt-Signalwege entschlüsselt. Darauf aufbauend wurde Anfang der 90er Jahre die zentrale Bedeutung von p53 für die Tumorentstehung entdeckt (*LANE 1992*) und es wurde beobachtet, dass Zellen mit gestörter p53-Funktion nach DNA-Schaden nicht wie p53-kompetente Zellen in der G1-Phase arretieren (*KUERBITZ et al. 1992*).

Aufgrund dieser Entdeckungen ist etwas später das Konzept der G2-Zellzyklus-Kontrollpunkt-Durchbrechung postuliert worden (*RUSSELL et al. 1995*) (*POWELL et al. 1995*): Zellen mit gestörter p53-Funktion können nach DNA-Schaden nicht in G1 arretieren, sondern erst in G2. Stoffe wie Caffein durchbrechen auch diesen zweiten Zellzyklus-Arrest und es kommt zu vermehrtem Zelltod.

Hiervon wurde das allgemeine Prinzip abgeleitet, dass die Fehlregulation von Zellzyklus-Kontrollpunkt-Signalwegen, die den Tumoren in erster Linie genetische

Instabilität und hohe Proliferationsraten ermöglicht, zu ihrem Nachteil ausgenutzt werden kann, indem zusätzlich zu einer DNA-schädigenden Therapie verbleibende Sicherheitsmechanismen ausgeschaltet werden. Der Schaden wird für die Zelle zu groß und Zelltod wird eingeleitet. Im Prinzip wird so, durch Ausschaltung mehrerer zellulärer Kompensationsmechanismen für eine Zell-schädigende Situation, Zelltod eingeleitet, wobei die Ausschaltung eines Kompensationsmechanismus durch den anderen hätte kompensiert werden können („synthetic lethality“) (*GABRIELLI et al. 2012*).

In der Folge ist das Prinzip in verschiedenen Kombinationen aus DNA-schädigenden Stoffen und Hemmstoffen des G2-Zellzyklus-Arrestes erfolgreich getestet worden, während parallel das Wissen über die am G2-Zellzyklus-Arrest bzw. Mitoseeintritt beteiligten Proteine weiter zugenommen hat. Auf der Suche nach geeigneten Hemmstoffen des G2-Zellzyklus-Kontrollpunktes hat sich Caffein aufgrund hoher Toxizität für die klinische Anwendung als ungeeignet erwiesen. Auf der Suche nach alternativen Hemmstoffen, die auch klinisch anwendbar sind, ist man auf die als PKC-Inhibitor bekannte Substanz UCN-01 gestoßen (*BUNCH et al. 1996*). Obwohl dieser Stoff ein breites Wirkspektrum hat (*SAUSVILLE 2003*), hat er sich als verlässliches Instrument zur Durchbrechung des G2-Arrestes in der Grundlagenforschung erwiesen und ist in mehrere klinische Studien aufgenommen worden. Als Mechanismus wird die Inhibierung der Kinase CHK1 angenommen (*GRAVES et al. 2000*) (*BUSBY et al. 2000*), welche eine Rolle bei der Aktivierung des G2-Zellzyklus-Kontrollpunktes nach DNA-Schaden spielt. Es konnte mit verschiedenen Ansätzen gezeigt werden, dass eine gezielte CHK1-Inhibierung für eine G2-Zellzyklus-Arrest-Durchbrechung ausreichend ist (*LUO et al. 2001*) (*CHEN et al. 2003*) (*MORGAN et al. 2005*). Die Arretierung des Zellzyklus in G2 wird so verhindert, ohne dass das Reparatursystem der G1-Phase von gesunden Zellen gestört wird.

Erste Ergebnisse aus klinischen Studien haben gezeigt, dass UCN-01 an α 1-Glykoprotein bindet und daher eine ungünstige Pharmakokinetik aufweist. In der Folge hat in den letzten Jahren eine intensive Suche nach alternativen Hemmstoffen, insbesondere spezifischen CHK1-Inhibitoren, begonnen (*TSE et al. 2007a*). Substanzen wie Chir124 (*TSE et al. 2007b*), PF-00477736 (*BLASINA et al. 2008*) oder AZD7762 (*ZABLUDOFF et al. 2008*) zeigen ein wesentlich engeres Wirkspektrum auf andere Kinasen im Vergleich zu UCN-01.

Die klinische Anwendung der G2-Zellzyklus-Arrest-Durchbrechung birgt allerdings auch Risiken. Zwar ist der unmittelbare Effekt auf den Zelltod für G1-, „Checkpoint“-defiziente Zellen spezifisch, es sind aber Langzeitschäden der Therapieform denkbar. Da eine Beteiligung von CHK1 in den letzten Jahren auch an mitotischen Prozessen nachgewiesen wurde (*ZACHOS et al. 2007*), ist nicht ausgeschlossen, dass eine Inhibierung zu fehlerhaften Mitosen, Aneuploidie und der Entstehung von Sekundärtumoren führt.

Eine Komponente des Prinzips der Durchbrechung des G2-Arrestes ist die Einleitung des Zelltodes durch den Eintritt in die Mitose. Wahrscheinlich führt eine stark geschädigte DNA zu mitotischen Defekten, die einen mitotischen Arrest auslösen, in Folge dessen der Zelltod eingeleitet wird. Dieses Prinzip einer fehlerhaften Mitose und assoziiertem Zelltod kann auch durch andere Mechanismen eingeleitet werden.

In den letzten Jahren sind große Fortschritte im Verständnis der mitotischen Prozesse gemacht worden und es wurden chemische Inhibitoren gegen beteiligte Proteine entwickelt (*JACKSON et al. 2007*). Inwiefern neue Inhibitoren, die mit Signalwegen der Mitose interagieren und so Zelltod auslösen können („antimitotische Therapie“), für die Chemotherapie geeignet sind, ist ein Schwerpunkt aktueller Forschung (*SCHMIDT et al. 2007*). Zwar stellen sie eine unspezifische Antiproliferationstherapie dar, beeinflussen aber häufig nicht das Tubulingerüst gesunder Zellen wie die klassischen Spindelinhhibitoren, womit weniger Nebenwirkungen in nicht-proliferierenden Zellen zu erwarten sind (*GASCOIGNE et al. 2009*). Da manche der mitotischen Regulationsproteine wie Aurora-A und Plk-1 in Tumoren mutiert oder fehlreguliert sind (*MACUREK et al. 2009*), könnten einige der Ansätze auch Tumorspezifität bieten. Besondere Bedeutung kommt dabei der Manipulation des Spindel-Kontrollpunktes zu, da dessen Fehlfunktion zu Aneuploidie führen kann und damit möglicherweise an der Tumorentstehung beteiligt ist. Ein aktuelles Modell ist, dass eine leichte Beeinträchtigung des Spindel-Kontrollpunktes zu Aneuploidie führt, eine schwere Beeinträchtigung aber zu Zelltod (*KOPS et al. 2005*). Daher kann es in Spindel-Kontrollpunkt-defizienten Zellen sinnvoll sein, zusätzlich den verbleibenden Spindel-Kontrollpunkt-Mechanismus zu inhibieren (*STOLZ et al. 2009*).

2.5 Apoptose

Die Apoptose ist eine regulierte Form des Zelltodes, bei der durch äußere oder innere Auslöser ein der Zelle eigener Signalweg eingeleitet wird, der zur Auflösung wichtiger Zellstrukturen führt, ohne das Nachbargewebe zu schädigen. Beim apoptotischen Prozess wird die DNA zu kleinen Bruchstücken degradiert, das Zytoskelett wird zerstört, Nukleus und Zytoplasma kondensieren und schließlich schnüren sich Teile der Zellmembran als so genannte apoptotische Körperchen nach außen ab („Membrane-Blebbing“), die von benachbarten Zellen phagozytiert werden können. Diese Vorgänge führen zu einer charakteristischen Morphologie, die mikroskopisch beobachtet werden kann (*KERR et al. 1972*).

Die Einleitung der Apoptose kann über einen extrinsischen (von außen) und einen intrinsischen (von innen) Signalweg erfolgen. Initiierende Komponenten des extrinsischen Weges sind ein transmembranöser Rezeptor (Todesrezeptor) und ein Ligand, der von anderen Zellen sezerniert werden kann oder ihrer Oberfläche anhaftet. Der intrinsische Weg wird durch eine Vielzahl von Signalen wie DNA-Schaden, metabolische Störungen oder der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren eingeleitet und nutzt das Mitochondrium oder das endoplasmatische Retikulum als wichtige Integrationsstelle pro- und antiapoptotischer Signale. Beide Wege münden in der Regel in der Aktivierung von Caspasen, die einen Großteil der Abbauprozesse direkt einleiten, indem sie hunderte zellulärer Substrate spalten.

Caspasen

Caspasen sind Zystein-Proteasen, die im Zytoplasma der Zelle in großer Zahl als Zymogene (inaktive Vorstufen) vorliegen. Durch Spaltung ihrer Substrate an Aspartatresten leiten sie die typischen apoptotischen Abbauprozesse ein: Durch Spaltung von Laminen und Aktin wird das Zytoskelett destabilisiert und durch Aktivierung von Nukleasen (*ENARI et al. 1998*) oder Spaltung von an Reparaturprozessen beteiligten Proteinen wie dem Protein PARP („Poly(ADP-ribose) Polymerase“), wird die DNA-Degradierung eingeleitet.

Die Aktivierung der Caspasen ist kaskadenartig aufgebaut. Verschiedene proapoptotische Proteine aktivieren Initiatorcaspasen wie Caspase-8 und -9, die dann Effektorcaspasen z.B. Caspase-3,-6, und -7 durch proteolytische Spaltung aktivieren (*THORNBERRY et al. 1998*).

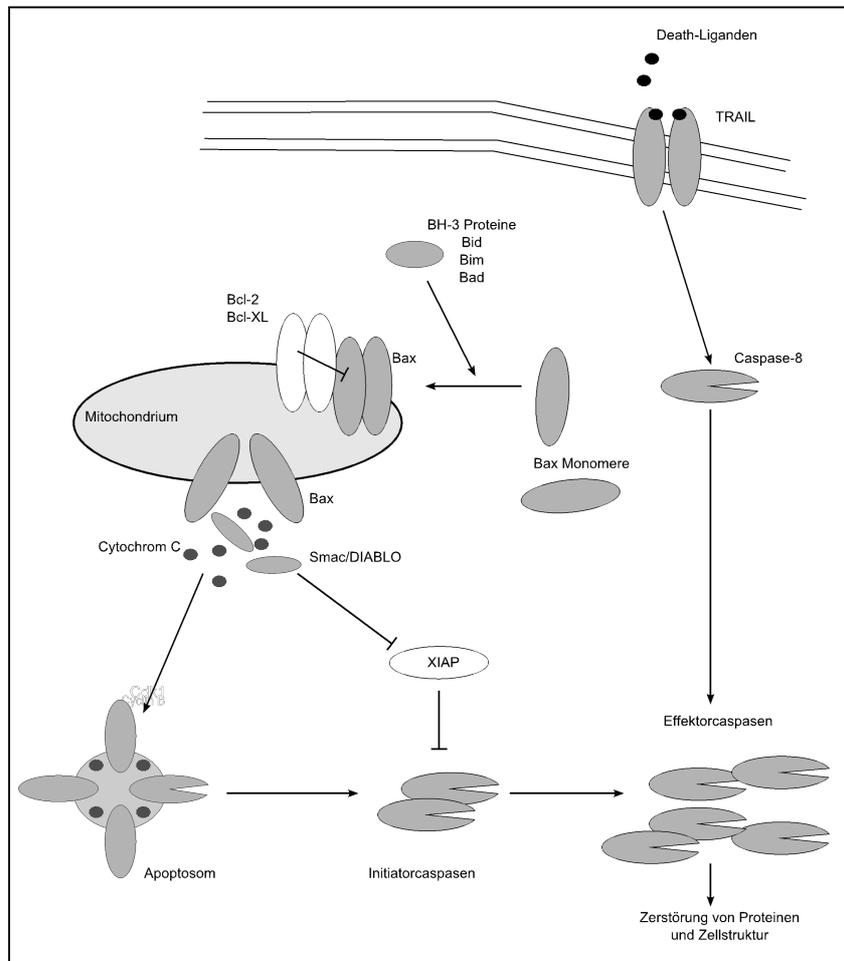


Abb. 2.4: Grundlegende Mechanismen der Apoptose mit Darstellung des intrinsischen (mitochondrialen) und extrinsischen Apoptoseweges. Der extrinsische Signalweg kann durch Faktoren außerhalb der Zelle, die an bestimmte Rezeptoren binden, eingeleitet werden, wobei Caspase-8 für die Signaltransduktion wichtig ist. Der intrinsische Signalweg nutzt das Mitochondrium als Schaltstelle wichtiger pro- und antiapoptotischer Signale. Bei Überwiegen proapoptotischer Signale kommt es zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und Freisetzung verschiedener Faktoren, die in der Folge die Caspasenkaskade aktivieren. Die zahlreichen Proteine der Bcl-2-Familie (Bax, Bcl-2, Bid) nehmen mit pro- und antiapoptotischen Faktoren eine Schlüsselstellung in der Regulation der mitochondrialen Apoptose ein.

Mitochondriale Apoptose

Das Mitochondrium ist die zentrale Integrationsstelle für den intrinsischen Apoptoseweg und ist unter manchen Bedingungen auch in die Signaltransduktion des extrinsischen Weges einbezogen. Viele Signale zur Einleitung von Zelltod interagieren mit pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, deren Gleichgewicht die Auslösung des mitochondrialen Apoptosemechanismus reguliert. Bei einem Überwiegen proapoptotischer Signale oligomerisieren proapoptotische Bcl-2-Proteine und lagern sich in die äußere Mitochondrien-Membran ein. Dies erhöht die Permeabilität der Membran (MOMP „Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation“) und führt zur Freisetzung von Cytochrom-c und anderer Faktoren

aus dem Intermembranspalt des Mitochondriums. Cytochrom-c bindet an Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1) und trägt zur Bildung des so genannten apoptosomalen Komplexes bei, welcher die Initiatorcaspase Procaspase-9 aktiviert. Caspase-9 aktiviert dann die Effektorcaspasen Caspase-3,-6 und -7 (*GREEN et al. 2004*).

Bcl-2 Familie

Die ca. 25 Proteine der Bcl-2-Familie besitzen BH-Domänen („Bcl-2 homology“) als gemeinsame Strukturelemente, die zur Interaktion untereinander in Form von Homo- und Heterodimerisierungen genutzt werden (*YOULE et al. 2008*). Gegenwärtig werden sie in drei funktionelle Untergruppen aufgeteilt:

Die proapoptotischen Faktoren wie z.B. Bax, Bak, Bok und Bcl-X_S lagern sich nach Stimulation in die äußere Mitochondrienmembran ein, oligomerisieren und führen so zur Freisetzung von Substanzen wie Cytochrom-c aus dem Intermembranspalt. Antiapoptotische Faktoren wie z.B. Bcl-2, Mcl-1 und Bcl-X_L können die proapoptotischen Faktoren binden und die Freisetzung von Cytochrom-c verhindern. Für eine dritte Gruppe ebenfalls proapoptotischer Faktoren, den so genannten „BH3-only“-Proteinen, wie z.B. Bid, Bim, Bad werden zwei Wirkmechanismen diskutiert. Entweder aktivieren sie direkt proapoptotische Faktoren wie Bax und Bak oder sie inhibieren antiapoptotische Faktoren wie Bcl-2 und ermöglichen so indirekt die Aktivierung der Bax/Bak-Gruppe. Neuere Experimente zu Strukturaufklärungen der Interaktionen dieser Proteine stärken die erste Hypothese (*KIM et al. 2009*).

Die zahlreichen Mitglieder der Bcl-2-Familie sind an der Mehrzahl der apoptotischen Prozesse beteiligt. Da Apoptoseresistenz eine wichtige Tumoreigenschaft ist, kann eine vermehrte Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 zur Tumorentstehung beitragen und zu einer Malignitätszunahme führen. Antiapoptotische Proteine der Familie sind daher potentielle Onkogene und proapoptotische Proteine potentielle Tumorsuppressorgene. Mutationen finden sich in einer Vielzahl von Tumoren. Die Translokation t(14/18) beispielsweise, die das Bcl-2-Gen in Reichweite des „Enhancers“ für das stark exprimierte Gen der schweren Immunglobulinkette bringt, findet sich typischerweise in B-Zell-Lymphomen und einer Reihe anderer Tumorarten.

IAPs („Inhibitors of Apoptosis“)

Die IAPs bilden eine weitere Proteinfamilie zur Regulierung der Apoptose. Sie besitzen BIR-Domänen als gemeinsames Strukturelement, die manchen IAPs zur Caspasenbindung und deren Inhibierung dienen. Dabei können sowohl Initiatorcaspasen als auch Effektorcaspasen inhibiert werden. Zu der Familie zählen z.B. die Proteine NAIP, c-IAP, XIAP und Survivin. Für XIAP, welches Caspase-9, -3, und -7 inhibiert und vermehrt in Leukämien, Lungenkrebs und Prostata-Tumoren exprimiert wird, ist das Konzept der direkten Caspaseninaktivierung etabliert. Für die anderen Mitglieder der Gruppe wurde es jedoch in den letzten Jahren stark in Frage gestellt (*ECKELMAN et al. 2006*), womit dieser Mechanismus innerhalb der Familie eher die Ausnahme als die Regel darzustellen scheint.

Als weitere apoptotische Regulationsebene existiert eine heterogene Gruppe von Inhibitoren der IAP-Familie. Hierzu gehören z.B. Smac/DIABLO und Omi/HtrA2. Sie werden ebenfalls im Rahmen der MOMP aus dem Intermembranspalt des Mitochondriums entlassen und wirken synergistisch mit dem proapoptotischen Cytochrom-c, indem sie die Hemmung der eingeleiteten Caspasenaktivierung unterdrücken (*DEVERAUX et al. 1999*).

Survivin

Survivin ist das kleinste Protein der IAP-Familie. Es ist in differenzierten Geweben so gut wie nicht nachzuweisen, jedoch in einem Großteil aller Tumoren stark hoch reguliert (*AMBROSINI et al. 1997*). Einerseits scheint es eine für IAP-Proteine typische, vorwiegend antiapoptotische Rolle in der Zelltodregulation zu spielen, andererseits ist es als Teil des „Chromosomal-passenger“-Komplexes für den fehlerlosen Ablauf der Mitose unerlässlich. Eine Inhibierung der Survivinfunktion führt in einer Vielzahl von Tumormodellen zur Einleitung von Zelltod (*ALTIERI 2003*). Die molekularen Mechanismen der Zellschutzfunktion Survivins sind bis heute Gegenstand intensiver Forschung. Erschwert wird das Verständnis der Survivin-Biologie durch die Expression von über sechs verschiedenen Splice-Varianten, die untereinander Homo- und Heterodimere bilden können. Vieles deutet darauf hin, dass Survivin als diagnostischer Marker für eine Vielzahl von Tumorarten eingesetzt werden kann, da es mit Malignitätsgrad und Prognose korreliert (*ALTIERI 2008a*). Zahlreiche therapeutische Ansätze zur Manipulation der Survivinfunktion befinden sich in

klinischen Studien, die bisher jedoch noch keinen durchschlagenden Erfolg zeigen konnten (*ALTIERI 2008b*).

Zelltod nach Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes

Die Zelltod assoziierten Signalwege nach Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes sind bisher noch nicht im Einzelnen untersucht worden. Forschungsarbeiten zu dieser Behandlung haben sich in vielen Fällen darauf beschränkt, den Mechanismus der G2-Arrest-Durchbrechung zu untersuchen und den Zelltodeffekt durch Auszählung apoptotischer Zellen abzuschätzen.

Es wurde beobachtet, dass die in die Mitose eintretenden Zellen mit nicht-repariertem DNA-Schaden in einem mitotischen Arrest angehalten werden und dann sterben. Dabei nimmt ein Teil von ihnen an Größe zu und bildet Mikronuklei mit unkondensiertem Chromatin aus (*RONINSON et al. 2001*). Diese auffällige Morphologie, die im Rahmen einer fehlerhaften Mitose entsteht, wurde auch nach anderen Formen der Zellschädigung beobachtet und mit dem Begriff „Mitotische Katastrophe“ bezeichnet. Es wird diskutiert, ob es sich dabei um eine spezielle Form der Apoptose handelt, die mit Caspasenaktivierung und mitochondrialer Membranpermeabilisierung einhergeht (*CASTEDO et al. 2004*), oder um eine neue, eigenständige Form des Zelltodes (*RONINSON et al. 2001*).

Zielsetzung der Arbeit

Das Prinzip der Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes verspricht eine Effizienzsteigerung klassischer DNA-schädigender Therapien bei Tumorspezifität für G1-Kontrollpunkt-defiziente Zellen. Da mindestens 50% aller Tumoren einen defekten G1-Kontrollpunkt durch Funktionsverlust von p53 haben, könnte eine entsprechende Therapie breit angewendet werden. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis der assoziierten DNA-Schaden-Signalwege sowie von mitotischen und apoptotischen Prozessen gemacht wurden, ist die Regulation von Zelltod nach einer G2-Kontrollpunkt-Durchbrechung bisher wenig verstanden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die nach kombinierter Chemotherapie des DNA-schädigenden Stoffes Adriamycin mit dem CHK1-Hemmstoff UCN-01, an der Regulierung des Zelltodes beteiligt sind. Insbesondere sollte untersucht werden, ob Regulatoren der mitochondrialen Apoptose, wie Proteine der Bcl-2-Familie, und Komponenten des mitotischen Spindelkontrollpunktes dabei eine Rolle spielen und Ansätze für therapeutische Strategien darstellen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Geräte

Zentrifugen

Tischzentrifuge Typ Biofuge pico für 1,5 und 2ml Gefäße [Heraeus, Hanau]

Tischzentrifuge Typ Biofuge fresco für 1,5 und 2ml Gefäße, kühlbar [Heraeus, Hanau]

Multifuge 3L-R, kühlbar [Heraeus, Hanau]

Zentrifuge Modell GP für PP-Röhrchen/Zellkultur [Beckmann, München]

Zentrifuge Modell J2-21 M/E [Beckmann, München], mit Rotor JS 13-1

Photometer: SpectraMax 340 [MWG-Biotech, Ebersberg]

Heizblock: Modell Dri-Block 08-3 [Techne, Dextford-Cambridge, England]

Blot-Apparatur: Semi-Dry Transfer Cell, Trans-Blot SD [Biorad, Krefeld]

Netzgeräte

Power Pac 300 [BioRad, Krefeld]

Power Supply Modell PS 500x DC [Hoefer Scientific Instruments, USA]

Zellkultur Arbeitsbank: Heraeus LaminAir HA 2448 [Heraeus, Osterode]

Zellkultur Inkubator: Cytoperm 8080 oder BBD 6620 [Heraeus, Hanau]

Bakterienkultur Inkubator: Heraeus B6120 [Heraeus, Hanau]

Lichtmikroskop: Leitz Labovort FS [Leica Geosystems GmbH, München]

Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axiovert 40 CFL [Zeiss AG, Oberkochen]

Elektroporator: Gene Pulser [BioRad, Hercules, USA]

Durchflusszytometer: BD FACS Calibur [Becton Dickinson, San Jose, USA]

Fluorometer: Victor 1420 Multilabel Counter [Wallac Oy, Turku,

Finnland und Perkin Elmer, Freiburg]

Sonifiziergerät: Branson Sonic Power sonifier model S125 [Branson, Danbury, USA]

UV-Strahler: UV Stratalinker 2400 [Stratagene, Amsterdam, Niederlande]

Milli-Q Water Purification System [Millipore, Eschborn]

Lösungen, Puffer, Medien

Puffer

PBS (phosphate buffered saline)	6,5mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5mM KH ₂ PO ₄ 2,5mM KCl, 140mM NaCl; pH 7,25; autoklaviert
TBS (tris buffered saline)	50mM Tris/HCl, 0,9% (w,v) NaCl; pH 7,2
TBST (TBS mit Tween)	TBS mit 0,1% Tween-20; pH 7,2

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten den höchsten Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).

Inhibitoren, Zytostatika

Alle verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.A.. Sie wurden, falls an anderer Stelle nicht anders vermerkt, in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

Substanz	Zielstruktur	Hersteller	Konzentration
Adriamycin (Doxorubicin Hydrochlorid)	Hemmung der Topoisomerase II	Sigma, Steinheim, Germany	Stammlösung: 1mM in H ₂ O Endkonzentration: 300nM
ALLN (Calpain Inhibitor 1)	Proteasom-Inhibitor	Alexis, Grünberg, Germany	Stammlösung: 40mM Endkonzentration: 200µM
Actinomycin D	Hemmung der RNA Polymerase I, II, III	Alexis, Grünberg, Germany	Stammlösung: 1mg/ml Endkonzentration: 10 µg/ml
Camptothecin	Hemmung der Topoisomerase I	Alexis, Grünberg, Germany	Stammlösung: 10mM Endkonzentration: 10µM
Cycloheximid	Hemmung der Translation und RNA Polymerase I	Calbiochem, Schwalbach, Germany	Stammlösung: 35mM Endkonzentration: 175µM
LY294002	Hemmung von PI3K	Calbiochem, Schwalbach, Germany	Stammlösung: 20mM Endkonzentration: 30µM

Material und Methoden

Nocodazol	Herabsetzung der Mikrotubuli-Stabilität	Sigma, Steinheim, Germany	Stammlösung: 2mM Endkonzentration: 150nM
Roscovitine	CDK-Hemmung	Calbiochem, Schwalbach, Germany	Stammlösung: 20mM Endkonzentration: 30µM
SB203580	Hemmung von p38 (MAPK)	Alexis, Grünberg, Germany	Stammlösung: 10mM Endkonzentration: 40µM
Taxol	Verhindert Spannungsaufbau der mitotischen Spindel	Sigma, Steinheim, Germany	Stammlösung: 1mM Endkonzentration: 100nM
UCN-01 (7-Hydroxystaurosporine)	Hemmung von CHK1 und anderen Kinasen	National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA	Stammlösung: 1mM Endkonzentration: 100nM
Rapamycin	Inhibierung von mTOR und Hemmung der Translation	Calbiochem, Schwalbach, Germany	Stammlösung: 100µg in 1ml Endkonzentration: 50ng/ml
ZM447439	Hemmung von Aurora-B	Astra-Zeneca Pharmaceuticals, Cheshire, United Kingdom	Stammlösung: 1mM Endkonzentration: 2µM

Antikörper für Westernblot

Primär-Antikörper

Primär Antikörper wurden in 5% BSA (Bovine Serum Albumin, Albumin Fraction V) [Roth, Karlsruhe] in TBS entsprechend den angegebenen Verdünnungen gelöst und maximal 2 Monate bei 4°C gelagert.

Antikörper	Spezies	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
β-Aktin (42kD)	Maus	Sigma, Steinheim	2,7 µg/µl	1:8000
Bax (Ab-6)	Maus monoklonal	Calbiochem, Schwalbach	0.1 µg/µl	1:500
Bcl-2 (Ab-1)	Maus	Calbiochem, Schwalbach	-	1:250
BubR1 (SBR13)	Schaf	S.Taylor,	-	1:400

Material und Methoden

	polyklonal	Manchester, England		
Cyclin-B (GNS-1)	Maus monoklonal	Santa Cruz, Santa Cruz	0.1 µg/µl	1:1000
p-H2AX (Ser319)	Maus monoklonal	Upstate, Lake Placid, NY, USA	0.7 µg/µl	1:1000
Mad2	Kaninchen polyklonal	Berkeley Antibody Company, Richmond, USA	-	1:1000
MPM2 (mitotic protein monoclonal 2)	Maus monoklonal	Upstate, Lake Placid, NY, USA	1 µg/µl	1:1600
Survivin	Kaninchen polyklonal	Research & Development Systems, San Diego, CA, USA	1 µg/µl	1:2000
α-Tubulin (50kD)	Maus monoklonal	Sigma, Steinheim	2 µg/µl	1:800

Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper wurden in 2% Milchpulver [Roth, Karlsruhe] in TBS, entsprechend den angegebenen Verdünnungen, gelöst und bei -20° für spätere Verwendung gelagert.

Antikörper	Spezies	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
Anti-Maus HRP	Ziege Polyklonal	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA	0.4 µg/µl	1:4000 – 1:5000
Anti-Kaninchen HRP	Ziege Polyklonal	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA	0.4 µg/µl	1:4000 – 1:5000
Anti-Schaf Peroxidase konjugiert	Kaninchen	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Dianova, Hamburg, Deutschland	-	1:4000

3.2 Zellkultur

Für alle Experimente wurden humane HeLa-Zellen (Zervix Karzinom Zelllinie) verwendet.

Kulturmedium

Bestandteile

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) [PAA, Cölbe]

FCS (Fetal calf serum) [Invitrogen, Karlsruhe]

L-Glutamin, 200mM-Lösung [Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien]

Penicillin-/Streptomycin-Lösung, Penicillin 10000units/ml, Streptomycin 10000µg/ml [Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien]

Kulturmedium

DMEM wurde mit 10% (v/v) FCS, 1:100 L-Glutamin und 1:100 Penicillin-/Streptomycin-Lösung versetzt und vor Gabe auf die Zellen erwärmt.

Passagieren

Für alle Experimente wurden, falls nicht anders beschrieben, adhärent wachsende HeLa-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt in Kunststoffschalen (Nunc, Wiesbaden) mit Kulturmedium kultiviert. Sie wurden alle zwei Tage passagiert und im Verhältnis 1:5 erneut ausgesät. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, zweimal PBS auf die Zellen gegeben und jeweils wieder abgesaugt; schließlich wurde Trypsin/EDTA (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien) für einige Minuten bei 37° zugegeben. Die so abgelösten Zellen wurden in PBS resuspendiert und zentrifugiert (1000rpm, 5min, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und auf neue Wachstumsflächen verteilt. Für Experimente wurden die Zellen einen Tag vor der Behandlung ausgesät, um geeignete Konfluenz zu erreichen.

„Shake Off“

Zur Isolierung mitotischer Zellen aus einer Zellpopulation wurde ein „Shake Off“-Verfahren angewendet. Hierbei wurde mehrmals gegen die Kulturschale geklopft, so dass sich die nur noch leicht adhären, mitotischen Zellen von der Kulturschale

lösten. Das Kulturmedium wurde dann abpipettiert und mit den suspendierten mitotischen Zellen neu ausgesät.

UV-Behandlung

Die Zellen wurden UV-Licht von 254nm in einem UV Stratalinker 2400 (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) ausgesetzt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die offene Kulturschale in den Stratalinker gestellt und nach Behandlung wieder Kulturmedium zugegeben.

Zellernte

Das Medium wurde abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. PBS, versetzt mit 0,5mM EDTA, wurde zum Ablösen der Zellen für 10min bei Raumtemperatur zugegeben. Diese Suspension wurde in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Nürtlingen) überführt, zentrifugiert (1500rpm, 5min, RT) und das Pellet wieder in PBS resuspendiert.

Fixierung

Nach der Zellernte wurde tropfenweise eiskaltes, 70%ig vergälltes Ethanol auf die Zellen gegeben. Die Zellen konnten so am nächsten Tag weiter verwendet oder bei 4° bis zu einer Woche gelagert werden.

Propidiumiodid-Färbung

Geerntete und fixierte Zellen wurden in 80-100µl PBS mit 1µg/ml RNase resuspendiert und zum Abbau von RNA über Nacht bei 4° inkubiert. 50µg/ml PI (Propidiumiodid) [Sigma, Steinheim] in PBS wurde einige Minuten vor der Messung des Fluoreszenzsignals mit Hilfe von „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) zugegeben.

MPM2-Färbung

Die Zellen wurden geerntet und fixiert wie beschrieben. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension, nach Aufnahme in MPM2-Waschlösung, gewaschen: sie wurde zentrifugiert (4000 rpm, 4min, 4°), der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut in

Waschlösung aufgenommen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 60-100µl MPM2-Färbelösung mit MPM2-Antikörper [Upstate, Lake Placid, NY, USA, 1µg/µl] (Verdünnung 1:1600) resuspendiert. Es folgte eine zweistündige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal gewaschen und in MPM2-Färbelösung mit anti-Maus-DTAF Antikörper [Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, 0,75 µg/µl] (Verdünnung 1:400) oder anti-Maus Alexafluor 488 Antikörper [Molecular Probes, Leiden, Niederlande, 2 µg/µl] (Verdünnung 1:1600) resuspendiert. Die Zellen wurden eine Stunde auf Eis inkubiert. Sie wurden einmal in MPM2-Waschpuffer und einmal in PBS gewaschen, in PBS+RNAse Lösung resuspendiert und in FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Es folgte eine Über-Nacht-Inkubation bei 4°. Am folgenden Tag wurde die FACS-Messung durchgeführt. Für eine simultane Messung von MPM2- und PI-Signal im FACS-Gerät wurde einige Minuten vor der Messung 50µg/ml PI [Sigma, Steinheim] in PBS zugegeben.

MPM2-Waschlösung: 0,05% TritonX-100 in PBS

MPM2-Färbelösung: 0,2% TritonX-100, 2% FCS in PBS, Antikörper (s.o)

Durchflusszytometrie (FACS) zur Zellzyklusphasenbestimmung

Zur Zellzyklusphasenbestimmung wurde eine kombinierte Methode aus PI(Propidiumiodid)-Färbung und MPM2-Färbung angewandt. Das fluorometrisch aktive PI lagert sich in die DNA der Zellen ein und die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge der DNA einer Zelle. Somit kann der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmt werden. Der MPM2-Antikörper erkennt ein Phosphoepitop, das charakteristischerweise in der Mitose auf einer Vielzahl verschiedener Proteine erscheint. Ein fluoreszierender Sekundärantikörper gegen den MPM2-Antikörper erzeugt dann das Mitose-spezifische Fluoreszenzsignal. Die vom FACS-Gerät eingelesenen Daten wurden in Echtzeit an einen PC übertragen und dort mit der Software „CellQuestPro“ von BectonDickinson ausgewertet. Verwendet wurde ein FACS-Calibur-Fluorozytometer [BectonDickinson, San Jose, CA, USA].

FACS Einstellungen PI-FACS: FSC und SSC festgelegt, Kanal F3: PI-Signal, linear auf der x-Achse und Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse.

FACS Einstellungen MPM2-/PI-FACS: FSC und SSC festgelegt, Kanal F1: MPM2-Signal, logarithmisch auf der x-Achse, Kanal F3: PI-Signal, linear auf der y-Achse.

Elektroporation von Säugerzellen

Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet, zentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert und ein Teil in einer Zählkammer ausgezählt. $1,6 \times 10^6$ HeLa-Zellen wurden in 400 μ l Kulturmedium aufgenommen und mit zugegebener Plasmid-DNA in einem 1,5ml Gefäß vorsichtig durch 20faches auf-und-ab-Pipettieren gemischt. Nach Überführung in eine Elektroporationsküvette [BioRad, Hercules, CA, USA] wurden die Zellen in einem Gene Pulser [BioRad, Hercules, CA, USA] transfiziert (Einstellungen: 300V, 960 μ F für 20ms). Anschließend wurden sie in einer größeren Menge Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt. Circa 6 Stunden nach der Transfektion wurden die wieder adhärenen Zellen 2-3mal mit PBS gewaschen, um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.3 Biochemische Methoden

Herstellung von Proteinlysaten

Es wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension zwischen den einzelnen Schritten auf Eis stand. Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet und ein Teil der Zellen wurde für FACS-Analysen des mitotischen Index abgenommen. Die Zellen für die Lysatherstellung wurden noch einmal zentrifugiert (1000rpm, 5min, 4°), in 200-800 μ l Matsumoto-Lysepuffer (*HABU et al. 2002*) in 15ml Zentrifugenröhrchen resuspendiert und 15min auf Eis gestellt. Zum Aufbrechen der Zellmembran und größerer Zellorganellen wurden die Zellen in 3 Durchgängen zu je 20 Pulsen a 1sec sonifiziert (Stufe 2, Branson Sonic Power Modell S125, Branson, Danbury, CT, USA). Die entstandenen Lysate wurden dann in 1,5ml-Eppendorff Gefäße überführt und zur Trennung größerer Membran- und Organellenbruchstücke von den Proteinen bei 13000 rpm und 4° 15min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in neuen Eppendorff Gefäßen mittels Nitrogen bei -80° eingefroren oder sofort einer Proteinbestimmung zugeführt.

Lysepuffer:

1%(v/v) Nonidet-P-40, 50mM HEPES pH7,4, 250mM NaCl, 0,2mM EDTA,

5mM β -Glycero-phosphat, 2mM Na_3VO_4 , 10mM NaF,

direkt vor Gebrauch wurden dazugegeben:

0,04% (v/v) EDTA-freier Protease-Inhibitoren-Cocktail in Tablettenform (Roche, Penzberg), 500nM Mikrocystin, 1mM DTT Phosphataseinhibitoren

Quantifizierung von Proteinen (modifiziert nach Lowry)

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde ein modifizierter Lowry-Assay (BioRad DC Assay, Fa. Biorad, Krefeld) verwendet, der unabhängig von Detergenzien ist und so nicht durch die Zusammensetzung des Lysepuffers beeinflusst wird. Die Proteinlysate wurden langsam auf Eis - oder schneller bei 4° - von -80° aufgetaut. Auf eine 96-Microwell-Titer-Platte wurde eine Eichreihe mittels Wasser und BSA-Lösung (1mg/ml) als Proteinstandard pipettiert. Für die zu messenden Proben wurden je 9 μ l autoklaviertes Millipore-Wasser vorgelegt und dann 1 μ l des zu bestimmenden Lysates hinzugefügt. Alle Proben der Eichreihe und der Proteinlysate wurden doppelt angelegt, um das Ausmaß zufälliger Fehler zu begrenzen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Reagenzien des Biorad-Assays nach Angaben des Herstellers zugegeben. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 750nm in einem Spectramax 340. Aus den Standardwerten und der gemessenen Extinktion für die Proben konnte die Proteinkonzentration errechnet werden.

SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Das verwendete Gel setzte sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen. Das Sammelgel hatte eine Acrylamid-Konzentration von 5% und wurde mit 10%igem APS [Ammoniumpersulfat] und TEMED [N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin] polymerisiert. Zu 4ml Sammelgelmischung wurden 40 μ l APS und 4 μ l TEMED gegeben. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels variierte je nach aufzutrennendem Protein zwischen 12% und 19%. 9ml Trenngelmischung wurden mit 90 μ l APS und 4 μ l TEMED zur Polymerisation gemischt.

Die Proteinproben wurden mit 20% (v/v) 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5min bei 95° denaturiert und daraufhin zentrifugiert (13000rpm, 5min, 4°). Zum Einlaufen der

Proteine ins Sammelgel wurde die Elektrophorese zuerst mit 50V gestartet und nach 30-60min auf 100V erhöht. Je nach Proteingröße und Gelkonzentration wurde das Gel dann nach 1,5-3h abgebaut.

Acrylamid-Stammlösung:	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid-Fertigmix (Fa.Roth/Karlsruhe)
SDS-Sammelgelpuffer:	313mM Tris/HCl, 6,9 mM SDS; pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer:	3M Tris/HCl, 27,7 mM SDS; pH 8,8
Sammelgelmischung 5%:	8ml Acrylamid-Stocklösung, 24ml Sammelgelpuffer, 16ml H ₂ O
Trenngelmischung 12%:	19,2ml Acrylamid-Stocklösung, 6ml Trenngelpuffer, 22,8ml H ₂ O
SDS-Probenpuffer:	30% (w/v) Glycin, 3% (w/v) SDS [Natriumdodecylsulfat], 62,4mM Tris/HCl pH 6,8, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,2 μ g/ml Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer:	52mM Tris-Base, 53mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS; pH 8,6

Westernblot (semi-dry)

Bei dem semi-dry Blot-Verfahren werden lediglich Filterpapier, Gel und Nitrozellulosemembran mit Transferpuffer befeuchtet. Der Blot wurde auf der Anodenplatte der Transfer-Apparatur unter Ausstreichen von Luftblasen aufgebaut. Die Reihenfolge war von unten nach oben: 2 Filterpapiere Whatman 3MM chromatography paper [Whatman, Dassel], Nitrozellulose-Membran, Gel, 2 Whatman Filterpapiere.

Die Proteine wurden bei einem Strom von 0,7-1,5mA pro cm² Blotfläche für 2 Stunden übertragen. Die Membran wurde daraufhin mit Ponceau-S-Lösung gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen und die Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen. Die Ponceau-Lösung wurde mit Millipore-Wasser wieder ausgewaschen. Für 60min wurde die Membran daraufhin in einer 5%igen Milchpulver-TBS-Lösung geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Zur Auswaschung des Milchpulvers wurde viermal 5-10min mit TBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde in 5% BSA in TBS bei 4°C über Nacht zugegeben. Daraufhin wurde erneut viermal 5-10min mit TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in 2% Milchpulver/TBS für

zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler zugegeben. Zum Entfernen von ungebundenem Antikörper wurden drei Waschschrte mit TBST und daraufhin zum Entfernen von Tween-Resten zwei Waschschrte mit TBS durchgeführt. Gebundener Antikörper wurde mit einem Lumineszenz-Assay sichtbar gemacht [Super Signal West Pico oder Femto chemoluminescent substrate von Pierce, Rockford, USA oder Luminol Lösung]. Ein Fuji Medical X-Ray Film [Fujifilm, Düsseldorf] wurde zwischen einigen Sekunden bis mehreren Minuten auf dem Blot exponiert und entwickelt (Kodak X-Omat 2000 Processor machine [Kodak, New Haven, USA]).

Westernblot-Transferpuffer:	25mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol, zum Gebrauch wurde der Puffer 1:10 mit H ₂ O verdünnt
Ponceau-S-Lösung	0,2% Ponceau S in 3% TCA
Luminol-Lösung	Lösung A: 1mM Tris/HCl pH8,5, 25mM Luminol, 0,4mM β -Hydroxycoumarinsäure; Lösung B: 100mM Tris/HCl pH8,5, 0,03% H ₂ O ₂ . Die beiden Lösungen wurden unmittelbar vor Inkubation mit der Membran im Verhältnis 1:1 gemischt.

Caspase-Assay

Bei diesem Assay wird ein Substrat zur Zellsuspension gegeben, das durch Caspasen gespalten wird und dadurch ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Dieses Signal kann fluorometrisch bestimmt werden und korreliert mit der Menge aktiver Caspasen.

Am Tag vor der Caspase-Messung wurden je 100.000 Zellen pro Behandlung/Probe ausgesät. Die Zellen wurden nach Inhibitorenbehandlung wie beschrieben geerntet und ein zweites Mal zentrifugiert (1500rpm, 5min, 4°). Das Pellet wurde in 200 μ l PBS resuspendiert und je 40 μ l davon wurden in ein Well einer Mikrotiterplatte gegeben. Dabei wurden je Probe drei Wells bestückt, um die Größe zufälliger Fehler einschätzen zu können.

Die verbleibenden 80 μ l der Zellsuspension konnten verwendet werden, um mit MPM2-Färbung und FACS-Analyse den mitotischen Index der Probe zu bestimmen. In jedes Well wurden nun 10 μ l Caspasesubstrat (25 μ M in PBS) gegeben. Mittels einer auf 40 μ l eingestellten 200 μ l-Pipette wurde der Inhalt jedes Wells zweimal auf und ab

pipettiert und sogleich in einem Fluorometer der Anfangswert gemessen. Daraufhin wurde jede halbe Stunde bis 3 Stunden nach Messbeginn die Caspaseaktivität bestimmt. Zwischen den Messungen wurde die Mikrotiterplatte mit den Proben in einem Inkubator (bei 37°, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) gelagert. Die Ergebnisse wurden mit Excel ausgewertet. Die Signalstärke nach 150 oder 180min wurde für die Darstellung der Caspaseaktivität gewählt. Aus den Triplikaten wurden unter Ausschluss von Werten, die um mehr als 10% von den anderen beiden abwichen, Mittelwerte berechnet.

Caspase-Substrat	Ac-DEVD-AMC (BD PharMingen, Heidelberg) 1mM in DMSO Zum Gebrauch wurde eine Lösung 25µM Ac-DEVD-AMC in PBS angesetzt
Fluorometer:	Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac Oy, Turku, Finland and Perkin Elmer, Freiburg, Germany) Anregungswellenlänge: 355nm Emissionwellenlänge: 485nm

Immunpräzipitation von aktivem Bax

Die Immunpräzipitation wurde durchgeführt, um die aktive Konformation des Proteins Bax nachzuweisen. Hierbei wurden zur Bindung des konformationsspezifischen Antikörpers Sepharose-Beads eingesetzt. Durch Zentrifugation konnte dann das aktivierte Protein von den anderen Bestandteilen des Lysates getrennt und auf einem Westernblot nachgewiesen werden.

Die Zellen wurden wie beschrieben gerntet und lysiert. Hierbei wurde jedoch ein spezieller IP-Puffer (Immunpräzipitations-Puffer) verwendet und bei der Sonifizierung wurden je Probe nur einmalig 5-10 Pulse gegeben.

Mit dem Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. 500µg Protein wurden daraufhin mit IP-Puffer auf eine Konzentration von 2µg/µl eingestellt und für eine Stunde mit 20µl equilibrierter Protein-G-Sepharose-Beads versehen, um Proteine, die unspezifisch mit den Sepharose-Beads interagieren, vom Lysat zu trennen. Nach diesem „Pre-clearing“ wurde der Überstand abgenommen und mit 5µl des konformationsspezifischen Antikörpers anti-Bax (Klon

6A7, 0,1µg/µl) (Calbiochem, Schwalbach, Germany) gemischt. Eine anschließende Inkubation für 3,5 Stunden bei 4° und Rotation ließ dem Antikörper Zeit die spezifische Proteinform zu binden.

Die Sepharose-Beads wurden dreimal mit Lysepuffer gewaschen: Zugabe von Lysepuffer, Zentrifugation (2000g, 5min, 4°), Resuspension in Lysepuffer. Nach dieser Bead-Equilibrierung wurden 20µl der Beads zu den Proben gegeben und 2 Stunden unter Rotation bei 4° inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (2000g, 5min, 4°) und das Beadpellet dreimal mit Lysepuffer gewaschen, um alle nicht gebundenen Proteine und Zellbestandteile zu entfernen. Das entstandene Pellet wurde in 30µl Lysepuffer aufgenommen und 5min bei 95° erhitzt, um die Bindungen zwischen Bead, Antikörper und Protein zu lösen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden dann mit dem Westernblot-Verfahren (→3.4.4) auf eine Membran übertragen und mit Bax-Antikörper inkubiert.

IP-Puffer:

1% Triton-X100, 150mM NaCl, 10mM HEPES pH 7,5

direkt vor Gebrauch wurden dazugegeben:

0,04% (v/v) EDTA-freier Protease-Inhibitoren-Cocktail in Tablettenform (Roche, Penzberg),

0,1mM PMSF

4 Ergebnisse

Das zurzeit in klinischen Studien untersuchte Chemotherapie-Prinzip der Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes basiert auf der sequentiellen Gabe eines DNA-schädigenden Stoffes und eines CHK1-Hemmstoffes, der den durch DNA-Schaden ausgelösten G2-Zellzyklus-Arrest durchbricht. Damit wird Zellen mit gestörter p53-Funktion, trotz DNA-Schaden, der Eintritt in die Mitose ermöglicht, wo sie erneut arretieren und versterben (*VOGEL et al. 2005*).

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes und insbesondere die Regulation des damit verbundenen Zelltodes untersucht. Für alle Experimente wurde die HeLa-Zelllinie verwendet. Diese ist mit dem humanen Papillomavirus infiziert und exprimiert das virale Protein E6, welches p53 bindet und dem proteasomalen Abbau zuführt. Die gestörte p53-Funktion und die daraus resultierende Insuffizienz der p53-abhängigen DNA-Schaden-Kontrollpunkte sind Voraussetzungen für das Prinzip der G2-Arrest-Durchbrechung. Es wurde der Topoisomerase-II-Hemmstoff Adriamycin (= Doxorubicin) als DNA-schädigende Substanz verwendet. Der Hauptmechanismus dieser seit langem in onkologischen Therapieschemata verwendeten Substanz ist die Zufügung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Interaktion mit dem Enzym Topoisomerase-II (*TEWEY et al. 1984*). Ergänzend wurde der CHK1-Hemmstoff UCN-01 verwendet, der bei gestörter p53-Funktion einen durch DNA-Schaden vermittelten G2-Zellzyklus-Arrest durchbrechen kann.

4.1 Zellzyklusverteilung nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung

Um das Prinzip der Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes mit Adriamycin (ADR) und UCN-01 an HeLa-Zellen zu prüfen, habe ich die Zellzyklusverteilung behandelter Zellpopulationen quantitativ mit Hilfe von FACS-Analysen untersucht. Hierzu wurde eine kombinierte Methode aus PI(Propidiumiodid)-Färbung und MPM2-Färbung angewandt. Das fluorometrisch aktive PI lagert sich in die DNA der Zellen ein und die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Menge der DNA. Der MPM2-Antikörper erkennt ein mitosespezifisches Phosphoepitop. Ein fluoreszierender Sekundärantikörper gegen den MPM2-Antikörper erzeugt ein Mitose-spezifisches Fluoreszenzsignal. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts der verschiedenen Zellen einer

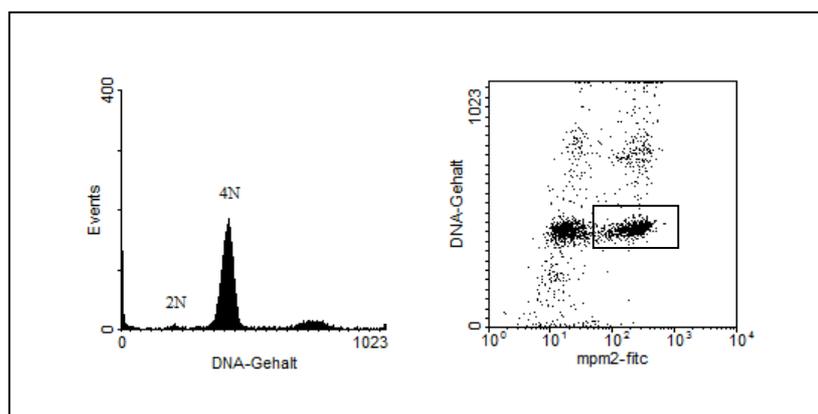


Abb. 4.1: FACS-Analyse der Zellzyklusverteilung mit den Markern PI (Propidiumiodid) und MPM2. Zellen wurden so behandelt, dass der Großteil in der G2-Phase oder in der Mitose mit einem 4N-DNA-Gehalt arretiert ist. Links und rechts ist dieselbe Zellpopulation dargestellt. Links: die PI-Färbung spiegelt den DNA-Gehalt der Zellen wider, somit ergibt sich bei Auftragung des PI-Signals gegen die Zellzahl ein Ereignismaximum, welches 4N-DNA-Gehalt entspricht. Rechts: Wird der mitotische Marker MPM2 gegen das PI-Signal (= DNA-Gehalt) aufgetragen, kann weiter differenziert werden, welche Zellen schon in die Mitose eingetreten sind (Kasten).

Zellpopulation wurde das PI-Signal im FACS gemessen. Für die grafische Auswertung wurde der DNA-Gehalt auf die x-Achse und die Anzahl der Zellen („Events“) auf die y-Achse gelegt. In Abbildung 4.1 wurde eine Zellpopulation so behandelt, dass der Großteil der Zellen in der G2-Phase oder in der Mitose arretiert ist. Der Großteil der Zellen hat also einen 4N-DNA-Gehalt. Dies spiegelt sich in der grafischen Auswertung als deutliches Ereignismaximum über einem PI-Wert von etwa 400 Einheiten (Einheiten für die PI-Signalstärke frei wählbar) auf der x-Achse wider (Abb. 4.1 links mit 4N beschriftet). Zur weiteren Differenzierung von mitotischen und G2-Phase-Zellen wurden MPM2-Signal und PI-Signal gleichzeitig im FACS gemessen. Für die grafische Auswertung wurde das MPM2-Signal auf die x-Achse (mpm2-fitc) und das PI-Signal auf die y-Achse gelegt. Für dieselbe Zellpopulation konnte nun bestimmt werden, welche Zellen sich mit 4N-DNA-Gehalt in der G2-Phase befinden und welche in der Mitose. Es findet sich wieder der Großteil der Zellen bei ungefähr 400 Einheiten für das PI-Signal (y-Achse) (Abb. 4.1-rechts). Diese Population wird in Richtung der x-Achse in zwei Populationen aufgeteilt. Die rechte Population entspricht einem viel stärkeren MPM2-Signal (logarithmische Skala) und damit mitotischen Zellen, die linke Population stellt Zellen in der G2-Phase dar, die schwächer durch den MPM2-Antikörper angefärbt werden. Um die mitotische Population wurde manuell ein Kasten gezogen (Abb. 4.1-rechts-Kasten) und die Zellzahl innerhalb des Kastens (vom Programm bestimmt) zur Gesamtzellzahl in Relation gesetzt. Dieser Wert (Gesamtzellzahl / Zellen im Kasten) wurde als „mitotischer Index“ der Zellpopulation definiert.

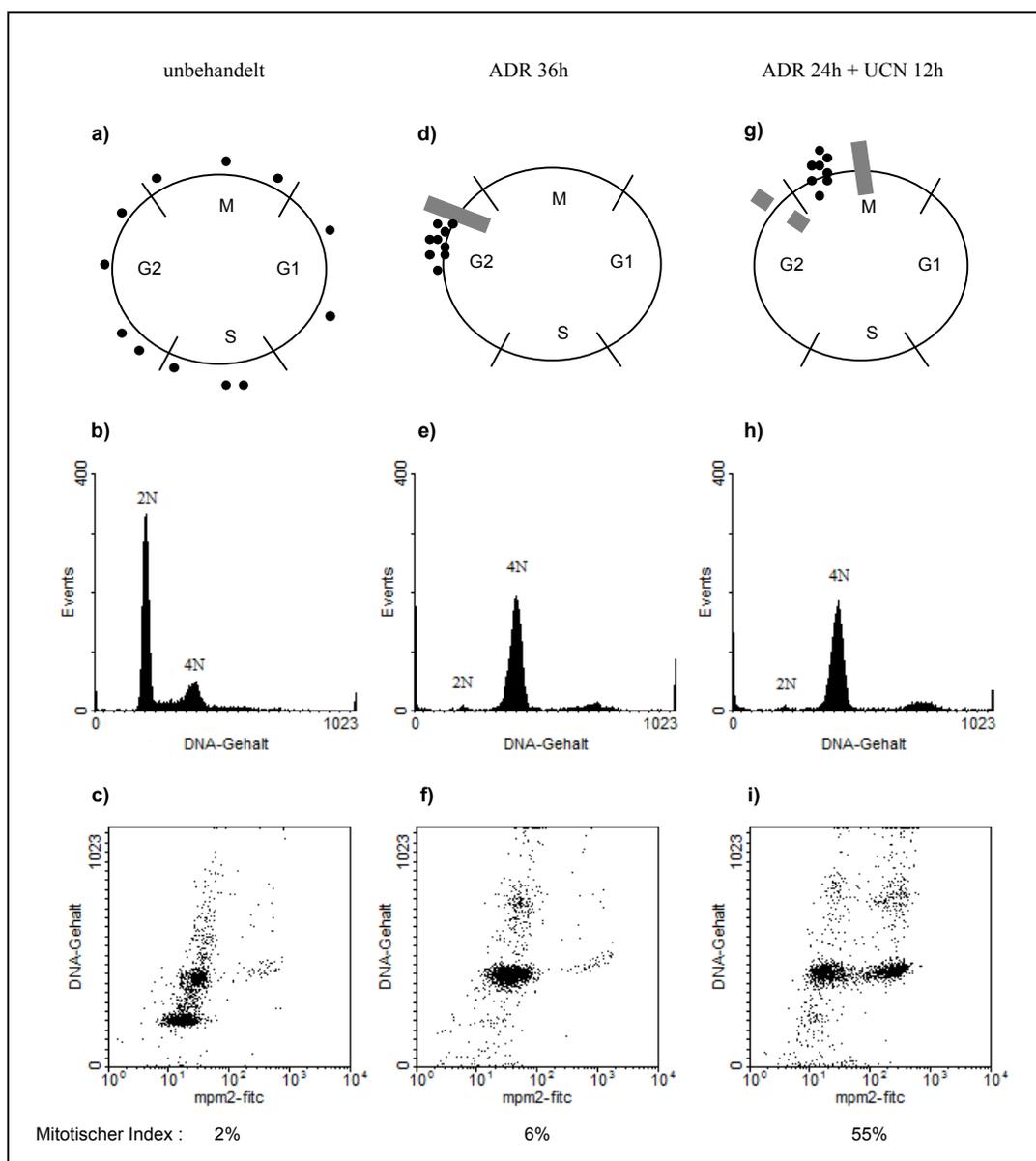


Abb. 4.2: FACS-Analyse der Zellzyklusverteilung nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung. In einer unbehandelten HeLa-Zellpopulation finden sich v.a. Zellen mit 2N-DNA-Gehalt (b), da die G1-Phase länger dauert als die anderen Phasen (nicht dargestellt). DNA-Schädigung durch eine 24- bis 36-stündige ADR(Adriamycin)-Behandlung arretiert fast alle Zellen vor der Mitose, was durch einen 4N-DNA-Gehalt (e) und fehlende Mitosephosphorylierungen (f) widerspiegelt wird. Die sequentielle Behandlung mit ADR für 24h und UCN-01 für 12h induziert in einem Großteil der Zellen ein starkes Signal für Mitosephosphorylierungen (i), bei ebenfalls vorwiegend 4N DNA-Gehalt (h). Die Zellen sind nach der Behandlung in die Mitose eingetreten, führen aber keine Zellteilung durch (Mitotischer Arrest).

In einer unbehandelten Zellpopulation finden sich Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Abb. 4.2-a). Da die G1-Phase unter physiologischen Bedingungen mehr Zeit einnimmt als die anderen Phasen, finden sich deutlich mehr Zellen mit 2N-DNA-Gehalt als Zellen mit 4N-DNA-Gehalt (Abb. 4.2-b). Es gibt nur wenige mitotische Zellen (Abb. 4.2-c).

Durch Adriamycin induzierter DNA-Schaden aktiviert „checkpoint“-Mechanismen, welche die Zellen in G1 und G2 solange arretieren, bis der DNA-Schaden behoben

oder Zelltod eingeleitet worden ist. HeLa-Zellen mit gestörter p53-Funktion können nicht in G1 arretieren, sondern nur durch den p53-unabhängigen Arm des G2-Kontrollpunktes. Da fast alle Zellen innerhalb von 24 Stunden einmal komplett den Zellzyklus durchlaufen, sind nach 24-stündiger Adriamycin-Behandlung nahezu alle Zellen am G2-Kontrollpunkt arretiert (Abb. 4.2-d). Da die Zellen sich hier nach der S-Phase und vor der Mitose befinden, erscheinen im FACS-Profil fast nur 4N-DNA-Gehalt-Zellen (Abb. 4.2-e), die bis auf wenige Ausnahmen keine Mitosemarker aufweisen (Abb. 4.2-f). Wird zusätzlich UCN-01 gegeben, treten die Zellen in die Mitose ein und werden erneut durch einen, im Detail nicht geklärten Mechanismus, vor Einleitung der Zellteilung arretiert (Abb. 4.2-g). Der Anteil der Zellen mit 4N-DNA-Gehalt ändert sich daher gegenüber der alleinigen Adriamycin-Behandlung nicht (Abb. 4.2-h), allerdings weist nun der Großteil der Zellen ein starkes Mitosespezifisches MPM2-Signal auf (Abb. 4.2-h). Nach einer 24-stündigen Adriamycin-Behandlung, gefolgt von einer 12-stündigen UCN-01-Behandlung, beträgt der Anteil mitotischer Zellen an allen Zellen etwa 55% (mitotischer Index). Neben dem mitotischen Index kann aus der FACS-Analyse auch der so genannte Sub-G1-Gehalt bestimmt werden. Dieser bezeichnet die registrierten Ereignisse, die deutlich weniger als 2N-DNA-Gehalt in der PI-Messung haben. Da keine gesunde Zelle weniger als 2N-DNA-Gehalt besitzen sollte, kann angenommen werden, dass diese Ereignisse Bruchstücke von toten Zellen darstellen. Der Sub-G1-Gehalt kann somit zur Quantifizierung des Zelltodes genutzt werden.

4.2 Anreicherung mitotischer Zellen nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung

Wie sich kürzlich gezeigt hat, wird Zelltod nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung, nach Eintritt in die Mitose und in Abhängigkeit von der Funktion des Spindelkontrollpunktes eingeleitet (VOGEL *et al.* 2007). Zur Detektion apoptotischer Parameter sollten daher möglichst mitotische Zellen untersucht werden.

Nach sequentieller Behandlung mit Adriamycin und UCN-01 zeichnete sich ein maximaler mitotischer Index von etwa 65% zwischen 6 und 9 Stunden UCN-01-Behandlung ab (Abb. 4.3). Zellen einer Zellpopulation traten nach Gabe von UCN-01 nicht gleichzeitig unmittelbar in die Mitose ein, sondern benötigten, abhängig von zellinternen Faktoren und vermutlich lokal unterschiedlichen Chemotherapeutika-Konzentrationen, aufgrund des nicht gleichmäßigen Populationswachstums, hierfür bis

zu 9 Stunden. Auf der anderen Seite sterben zunehmend Zellen mit Dauer der UCN-01-Behandlung und führen zu einem Absinken des mitotischen Index bei länger andauernder Behandlung.

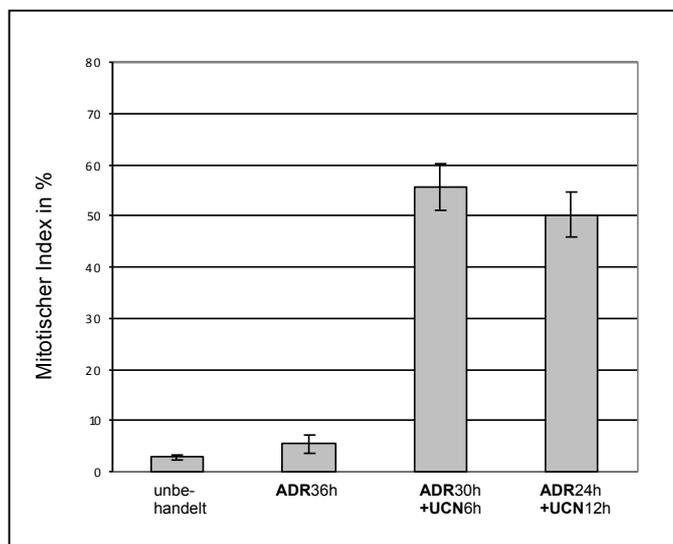


Abb. 4.3: Gehalt mitotisch arretierter Zellen, abhängig von Dauer der Inhibitorenbehandlung. Nach Inhibitorenbehandlung wurde aus Zellysaten mittels FACS-Analyse der mitotische Index bestimmt. Nach etwa 6 Stunden kombinierter Behandlung mit Adriamycin (ADR) und UCN-01 (UCN) befindet sich ein Großteil der Zellen im mitotischen Arrest. Nach 12 Stunden Behandlung kommt es zu keiner weiteren Zunahme des mitotischen Index.

Um einen höheren mitotischen Index zu erreichen, habe ich versucht mittels „Shake-Off“, nach kurzzeitiger UCN-01-Behandlung die mitotische Population von den, noch nicht in die Mitose eingetretenen, Zellen zu trennen. Nach einem „Shake-Off“, der nach 4-stündiger UCN-01-Behandlung durchgeführt wurde, konnte ein mitotischer Index von etwa 80% erreicht werden (Experiment nicht dargestellt). Es zeigte sich jedoch, dass die wieder ausgesäten Zellen nicht in der Lage waren unter diesen Bedingungen den mitotischen Arrest zu halten. Kurze Zeit nach „Shake-Off“ hatte der Großteil der Zellpopulation unabhängig von Resuspensionsmedium oder folgender Inhibitorenbehandlung den mitotischen Arrest abgebrochen. Möglicherweise ist die Neuaussaat und die damit verbundene Neuanhaftung der Zellen an der Kulturschale nicht mit dem Erhalt eines mitotischen Metaphasenarrestes vereinbar. Dieses Phänomen wurde in unserem Labor auch bei anderen, dem mitotischen „Shake-off“ vorhergehenden Behandlungen, durch welche die Zellen mitotisch arretiert wurden (z.B. klassische Spindelgifte wie Taxol und Nocodazol), beobachtet.

Da ein mitotischer Austritt in der Regel mit dem proteasomalen Abbau von Cyclin-B einhergeht, habe ich des Weiteren versucht, mit dem Proteasomen-Inhibitor ALLN den

mitotischen Austritt der Zellen zu blockieren. Es zeigte sich jedoch, dass auch mit ALLN der mitotische Austritt nach „Shake-Off“ nicht verhindert werden kann. Ein früher „Shake-Off“ mit darauf folgender Inhibitorenbehandlung ist somit nicht geeignet die apoptotischen Parameter im mitotischen Arrest zu untersuchen.

In einem weiteren Ansatz habe ich versucht mit ALLN-Gabe den mitotischen Index zu erhöhen (ohne Durchführung eines „Shake-Off“). Es ist beschrieben worden, dass nach Gabe von Spindelgiften, Zelltod erst nach dem mitotischen Austritt eingeleitet wird. Sollte dieser Mechanismus auch für die Adriamycin-/UCN-01-Behandlung wichtig sein, sollte mit der Blockierung des mitotischen Austritts die Ausführung des Zelltods verhindert und so ein höherer mitotischer Index erreicht werden. Es zeigte sich jedoch, dass eine Kombination mit ALLN den mitotischen Index nicht erhöht. Nach ALLN-Gabe stieg der mitotische Index nicht weiter an. Eine mögliche Erklärung ist, dass die proteasomale Funktion auch für den mitotischen Eintritt von Bedeutung ist und ALLN diesen, ebenso wie den Austritt, blockiert.

Zur Durchführung der nachfolgenden Experimente habe ich mich nach den beschriebenen Erkenntnissen für eine einfache sequentielle Inhibitorenbehandlung entschieden, bei der ein mitotischer Index zwischen 50 und 65% erreicht wird.

Die Mechanismen, die zum mitotischen Arrest nach G2-Arrest-Durchbrechung führen, sind nicht im Einzelnen verstanden. Vor allem über den, das Signal auslösenden Zustand, herrscht Unklarheit. Bei Nocodazol-Behandlung ist die Mikrotubuli-Depolymerisation und bei Taxol-Behandlung die verminderte Mikrotubuli-Dynamik der auslösende Faktor für die Aktivierung eines mitotischen Arrestes. Mögliche Mechanismen bei DNA-Schaden in der Mitose sind Gegenstand aktueller Forschung (*KIM et al. 2008*) (*MIKHAILOV et al. 2002*).

Um das Ausmaß des, durch die Behandlung bedingten, DNA-Schadens abzuschätzen, habe ich phosphoryliertes H2AX im Westernblot bestimmt. Die Phosphorylierung von H2AX ist ein Marker für DNA-Schaden und tritt insbesondere bei DNA-Doppelstrangbrüchen auf (*ROGAKOU et al. 1998*).

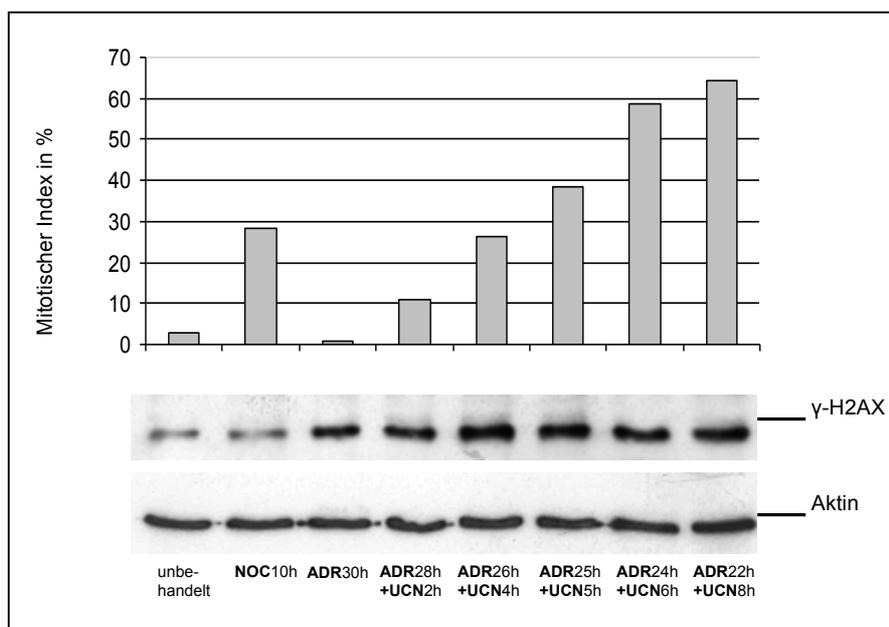


Abb. 4.4: Akkumulation von phospho-H2AX nach ADR-/UCN-01-Behandlung. HeLa-Zellen wurden mit Adriamycin (ADR), UCN-01 oder Nocodazol (NOC) behandelt. Nach Inhibitorenbehandlung wurden die geernteten Zellen aufgeteilt. Ein Teil wurde lysiert, um die Mengen an phosphoryliertem H2AX im Westernblot zu ermitteln (mit Aktin als Ladekontrolle). Ein anderer Teil wurde fixiert, um mittels FACS-Analyse den mitotischen Index zu bestimmen. Nach UCN-01-Behandlung ist eine, gegenüber alleiniger ADR-Behandlung verstärkte, Phosphorylierung des Histons H2AX zu beobachten.

Interessanterweise konnte nach UCN-01-Zugabe eine Zunahme an phosphoryliertem H2AX gegenüber alleiniger Adriamycin-Behandlung über den gleichen Zeitraum beobachtet werden (Abb. 4.4). Ein Anstieg der Phosphorylierung ist keine Eigenschaft eines mitotischen Arrestes *per se*, da Zellen, die durch Nocodazol in der Mitose arretiert wurden, diese nicht zeigten. Der DNA-Schaden scheint durch den Eintritt in die Mitose oder die UCN-01-Behandlung verstärkt zu werden.

4.3 Inaktivierung des proapoptotischen Proteins Bax

Für die Untersuchung der Signalwege des Zelltodes nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung habe ich Proteine der Bcl-2-Familie untersucht, die als wichtige Regulatoren des intrinsischen Apoptoseweges bekannt sind. Bax ist ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, das seine Funktion hauptsächlich in der Mitochondrienmembran erfüllt und nach Aktivierung die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran einleitet. Die Aktivität des Proteins wird vor allem durch eine Konformationsänderung reguliert (YAMAGUCHI *et al.* 2004). Zum Nachweis der aktiven proapoptotischen Konformation habe ich eine Immunpräzipitation mit einem konformationspezifischen Antikörper durchgeführt und die isolierten, aktiven Proteinformen auf einem Westernblot nachgewiesen.

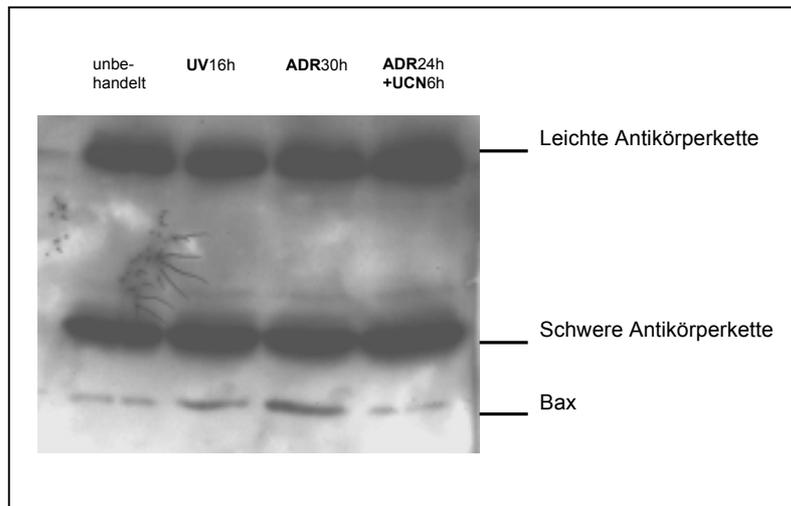


Abb. 4.5: Westernblot nach Immunpräzipitation von Bax. HeLa-Zellen wurden mit den chemischen Inhibitoren Adriamycin(ADR) und UCN-01 oder UV-Licht behandelt, anschließend wurden Zellysate erstellt. Diese wurden mit einem Antikörper inkubiert, der die aktive Konformation von Bax erkennt. Durch Inkubation mit Sepharose-Beads, die diesen Antikörper binden, sowie darauf folgende Zentrifugation und mehrfaches Waschen wurde aktives Bax vom restlichen Zellysat getrennt und im Westernblot quantifiziert. Die Behandlung mit UV-Licht dient als Positivkontrolle für die Bax-Aktivierung. ADR-Behandlung löst eine starke Bax-Aktivierung aus, die durch eine zusätzliche UCN-01-Behandlung wieder reduziert wird.

Das Experiment konnte zeigen, dass nach Adriamycin-Behandlung und der damit einhergehenden DNA-Schädigung vermehrt aktiviertes Bax vorliegt. Nach sequentieller Adriamycin-/UCN-01-Behandlung fiel der Proteinspiegel an aktiviertem Bax wieder stark ab und entsprach in etwa dem Niveau von unbehandelten Zellen. Die Einleitung von Apoptose nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung korreliert demnach nicht mit einer vermehrten Aktivität von Bax. Es ist interessant, dass ein bereits aktiviertes proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, unter Fortsetzung proapoptotischer Stimuli, mit Eintritt in die Mitose inaktiviert wird. Dies könnte Ausdruck einer Aktivierung protektiver (antiapoptotischer) Mechanismen während der Mitose sein.

4.4 Bcl-2-/Survivin-Expression nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung

Protektive Signalwege der Mitose, die eine Apoptosereaktion begrenzen, könnten Ansatzpunkte für eine Therapieverstärkung sein. Zur Untersuchung eines möglichen antiapoptotischen Signals habe ich im Folgenden den Proteingehalt von Bcl-2 und Survivin in Adriamycin-/UCN-01-behandelten Zellen bestimmt. Bcl-2 ist ein antiapoptotisches Protein, das in der Mitochondrienmembran als direkter Interaktionspartner von Bax bekannt ist. Durch Antagonisierung der proapoptotischen

Funktion von Bax durch Bcl-2 wird die Membranpermeabilisierung und Freisetzung von Cytochrom-c verhindert.

Survivin wird der IAP(Inhibitor of apoptosis)-Familie der Apoptoseregulatoren zugerechnet. Dem Protein wurden in den letzten Jahren Funktionen der Mitose- und Apoptoseregulation zugeschrieben. Einerseits wurde gezeigt, dass es unter bestimmten Bedingungen während der Mitose eine antiapoptotische Funktion inne hat (*O'CONNOR et al. 2000*), andererseits ist es als „chromosomal passenger protein“ an wichtigen mitotischen Prozessen beteiligt und könnte somit ein Bindeglied zwischen Mitose und Apoptose darstellen.

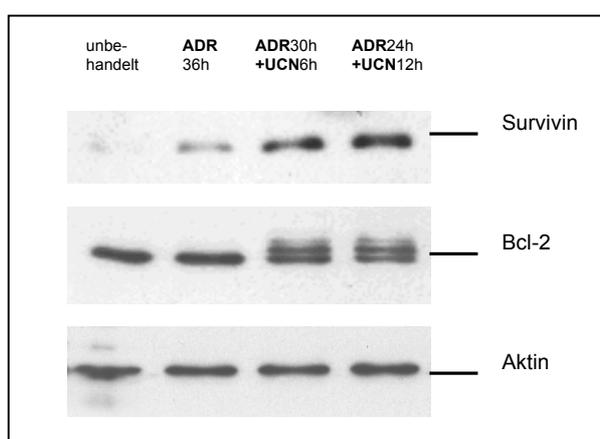


Abb. 4.6: Quantitative Bestimmung von Bcl-2 und Survivin im Westernblot nach ADR(Adriamycin)/UCN-01-Behandlung von HeLa-Zellen. Nach 30- oder 24-stündiger ADR-Behandlung wurde UCN-01 für 6h oder 12h zugegeben. Die Behandlung geht mit einem mitotischen Arrest eines Großteils der Zellen einher (→Abb. 4.3). Aktin dient als Kontrolle für gleichen Proteingehalt der Proben. Es treten zwei höher-molekulargewichtige Bcl-2-Signale bei ADR-/UCN-01-Behandlung auf, die vereinbar mit einer mehrfachen Phosphorylierung des Proteins sind. Survivin akkumuliert im mitotischen Arrest nach ADR-/UCN-01-Behandlung.

Im Westernblot zeigte sich eine Multi-Phosphorylierung des Proteins Bcl-2 nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung (Abb. 4.6). Schon in anderen Zusammenhängen wurde eine solche Phosphorylierung als Merkmal des Mitoseintrittes bzw. des mitotischen Arrestes beschrieben (*LING et al. 1998*). Die Bedeutung dieser Phosphorylierung für die Regulation der Apoptose konnte bisher nicht widerspruchsfrei aufgedeckt werden. Es zeigte sich weiterhin, dass Survivin im mitotischen Arrest nach DNA-Schädigung und Durchbruch des G2-Zellzyklus-Arrestes akkumuliert (Abb. 4.6).

4.5 Inhibierung von CDK1 nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung verstärkt den Zelltod

Die Akkumulation von Survivin nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung deutet auf einen Erhalt der protektiven Funktion des Proteins hin. Die Multi-Phosphorylierung von Bcl-2, in Kombination mit einer deutlichen Verminderung der aktiven Form von Bax, legt ebenfalls eine antiapoptotische Funktion dieser beiden zentralen Regulatoren der mitochondrialen Apoptose nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung nahe. Zusammengenommen lassen sich im mitotischen Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung sowohl apoptotische Parameter wie Cytochrom-c-Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung (*VOGEL et al. 2007*) als auch antiapoptotische Signale wie Bax-Inaktivierung und Bcl-2-Multiphosphorylierung beobachten. Es ist daher ein Konzept vorstellbar, in dem durch Adriamycin-/UCN-01-Behandlung während des mitotischen Arrestes Apoptose ausgelöst wird, deren Ausmaß jedoch durch einen antiapoptotischen Signalweg begrenzt wird. Ich habe im Folgenden geprüft, ob es auf pharmakologischem Weg möglich ist, die antiapoptotischen Signale abzuschwächen und damit die, durch Adriamycin-/UCN-01-Behandlung eingeleitete, Apoptose zu verstärken. Da keine direkten chemischen Inhibitoren von Bcl-2 oder Survivin zur Verfügung stehen, habe ich die Kinasen CDK1 und Aurora-B chemisch inhibiert, für die eine Interaktion mit Survivin während der Mitose beschrieben wurde. Um das Ausmaß der eingeleiteten Apoptose abzuschätzen, habe ich eine fluorometrische Caspase-3-Messung durchgeführt, die einen quantitativen Vergleich der Aktivität von Caspaseenzymen ermöglicht.

Es wurde gezeigt, dass eine antiapoptotische Funktion von Survivin in einem mitotischen Arrest nach Taxol-Behandlung von einer Phosphorylierung durch CDK1 abhängig ist und dass eine Inhibierung der Kinasefunktion von CDK1 mit Funktionsverlust von Survivin und Einleitung von Apoptose einhergeht (*O'CONNOR et al. 2000*). Sollte diese Interaktion zwischen CDK1 und Survivin auch im mitotischen Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung existieren, könnte eine Inhibierung von CDK1 zum Verlust der protektiven Funktion Survivins führen. Daher habe ich die Adriamycin-/UCN-01-Behandlung mit dem CDK1-Inhibitor Roscovitine (RV) kombiniert und die Caspase-3-Aktivität bestimmt.

Es ist des Weiteren bekannt, dass Survivin in der Mitose einen Komplex mit der Kinase Aurora-B bildet. Da diese ebenfalls für den mitotischen Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung notwendig ist (*VOGEL et al. 2007*), wäre es

möglich, dass im Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung der Komplex aus den beiden „Chromosomal passenger“-Proteinen an einem antiapoptotischen Signalweg beteiligt ist und eine Inhibierung der Kinase Aurora-B eine Apoptoseverstärkung bewirkt. Um dies zu testen, habe ich mit dem kürzlich beschriebenen niedermolekularen Kinase-Inhibitor ZM447439 (*DITCHFIELD et al. 2003*) die Kinaseaktivität von Aurora-B inhibiert.

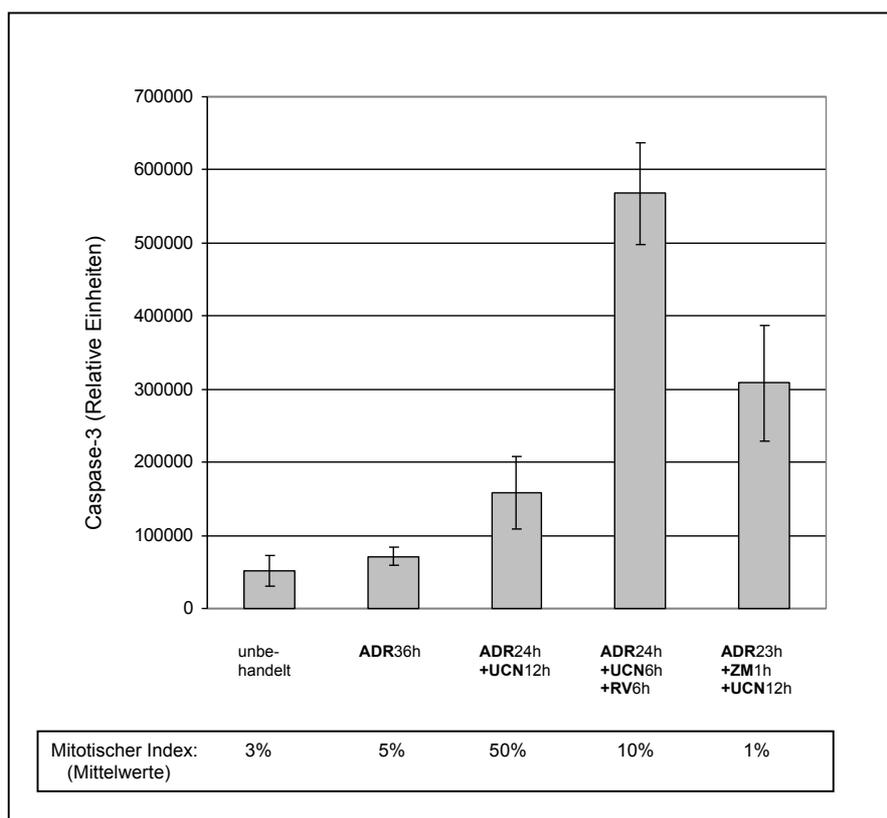


Abb. 4.7: Fluorometrische Caspase-3-Aktivitäts-Bestimmung nach Inhibitoren-Behandlung. HeLa-Zellen wurden für 24h mit Adriamycin (ADR) behandelt und anschließend mit UCN-01 (UCN) für 12h. Roscovitine (RV) wurde in den letzten 6h der UCN-01-Behandlung zugegeben. ZM447439 (ZM) wurde 1h vor UCN-01-Behandlung zugegeben. Mittelwerte wurden in Zusammenarbeit mit Celia Vogel aus 3 Experimenten gebildet. Der Gehalt mitotischer Zellen (mitotischer Index) der untersuchten Zellproben wurde im FACS bestimmt und aus 3 Experimenten gemittelt. Eine ADR-/RV-Kontrolle wurde im Verlauf der Untersuchungen nicht ständig mitgeführt, nachdem sich initial eine Caspase-3-Aktivität in der Größenordnung der Adriamycin-Einzelbehandlung zeigte (*VOGEL et al. 2007*). Wird der Aurora-B Inhibitor ZM447439 mit einer ADR/UCN-01-Behandlung kombiniert, kommt es, wie nach Roscovitine-Behandlung, zu einer verstärkten Caspaseninduktion.

Die CDK1-Inhibierung während des mitotischen Arrestes nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Caspaseaktivität (Abb. 4.7). Die Zellen traten dabei größtenteils wieder aus der Mitose aus. Dieses Ergebnis unterstützt das Konzept, dass eine Inhibierung antiapoptotischer Signale im mitotischen Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung zur Verstärkung der Apoptose führen kann, und ist ein Hinweis darauf, dass eine protektive Interaktion

zwischen CDK1 und Survivin auch im mitotischen Arrest nach DNA-Schaden und Durchbrechung des G2-Kontrollpunktes besteht.

Das Experiment bestätigte, dass auch die Inhibierung von Aurora-B zu einer verstärkten Caspaseinduktion führt (Abb. 4.7). Dies ist ein weiterer Hinweis auf einen protektiven Signalweg in der Mitose nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung. Aurora-B und CDK1 haben allerdings eine Vielzahl an Funktionen und Interaktionspartnern während der Mitose, deren Störung möglicherweise auch unabhängig von Survivin mit der Einleitung von Apoptose verbunden ist. Neben dem spezifischen Ansatz, einen protektiven Signalweg in der Mitose anzugreifen, kann von den gemachten Beobachtungen ein allgemeiner therapeutischer Ansatz abgeleitet werden: Die G2-Zellzyklusarrest-Durchbrechung synchronisiert vorgeschädigte Tumorzellen in der Mitose. Eine anschließende „antimitotische Therapie“, die den regulären Ablauf der Mitose und die Funktion des Spindelkontrollpunktes zusätzlich stört, kann die Apoptoserate deutlich erhöhen.

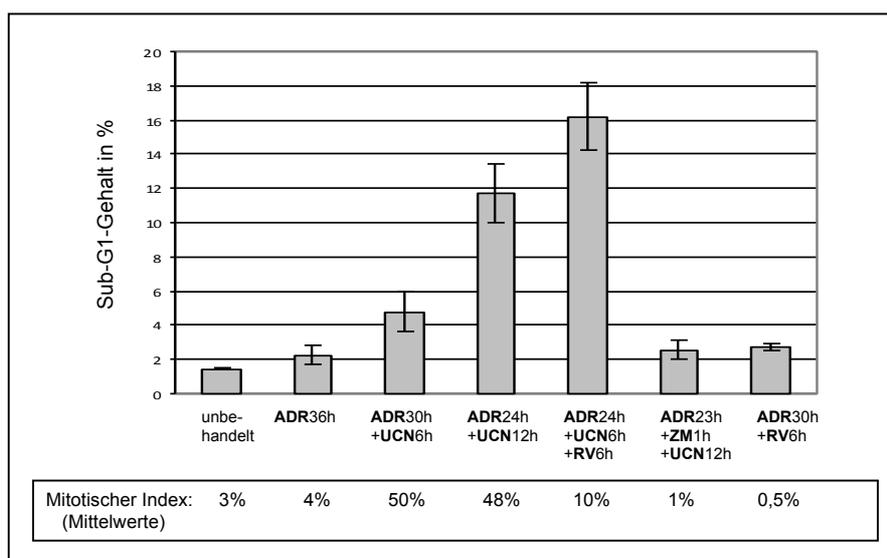


Abb. 4.8: Bestimmung des Sub-G1-Gehaltes im FACS. HeLa-Zellen wurden für 24h mit Adriamycin (ADR) behandelt und anschließend mit UCN-01 (UCN) für 6h oder 12h. Roscovitine (RV) wurde in den letzten 6h der UCN-01- bzw. ADR-Behandlung zugegeben. ZM447439 (ZM) wurde 1h vor UCN-01-Behandlung zugegeben. Mittelwerte wurden jeweils aus 3 Experimenten gebildet (ausgenommen ADR30h+RV6h-Probe, die aus 2 Experimenten gebildet wurde, da die Kontrollprobe bei den meisten Experimenten nicht mitlief). Der Gehalt mitotischer Zellen (mitotischer Index) der untersuchten Zellproben wurde im FACS bestimmt und aus 3 Experimenten gemittelt. Kombination von Adriamycin- mit UCN-01-Behandlung führt zu einem starken Anstieg des Sub-G1-Gehaltes, der durch zusätzliche Roscovitine-Behandlung weiter gesteigert wird.

Der Zelltod im Rahmen der Adriamycin-/UCN-01-Behandlung konnte auch anhand des Sub-G1-Gehaltes in der FACS-Analyse nachvollzogen werden (Abb. 4.8). Hier zeigte sich, noch deutlicher als mittels Caspasemessung, die Zunahme des Zelltodes

nach 12-stündiger UCN-01-Behandlung. Die Zugabe von Roscovitine verstärkte das Ausmaß des Zelltodes zusätzlich, jedoch nur wenn Zellen vorher mit UCN-01 in die Mitose gebracht wurden. Unklar ist, warum sich der Anstieg der Caspaseaktivität nach Behandlung mit ZM447439 nicht im Sub-G1-Gehalt widerspiegelt.

4.6 Verlust der Bcl-2-Phosphorylierung nach Inhibierung von CDK1

Falls Survivin und Bcl-2 Bestandteile des gleichen antiapoptotischen Signalweges sind, sollte nach Störung der protektiven Survivin-Funktion durch CDK1- oder Aurora-B-Inhibierung die Phosphorylierung von Bcl-2 wieder abnehmen. Um dies zu testen, wurde der Proteingehalt von Bcl-2 nach Adriamycin-/UCN-01/Roscovitine- sowie Adriamycin-/UCN-01/ZM447439-Behandlung bestimmt.

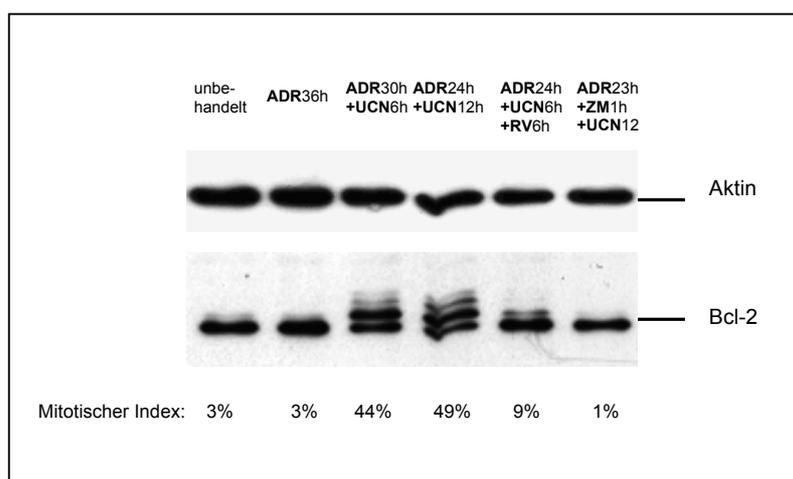


Abb. 4.9: Quantitative Bestimmung von Bcl-2 im Westernblot nach Inhibitoren-Behandlung von HeLa-Zellen. Nach 30- oder 24-stündiger Adriamycin(ADR)-Behandlung wurde UCN-01 für 6h oder 12h zugegeben. Zusätzlich wurde bei 12-stündiger UCN-01-Behandlung, 6 Stunden nach Beginn der UCN-01-Behandlung, Roscovitine (RV) und eine Stunde vor Beginn der UCN-01-Behandlung, ZM447439 (ZM) zugegeben. Aktin dient als Kontrolle für gleichen Proteingehalt der Proben. Die nach ADR-/UCN-01-Behandlung eintretenden höher-molekulargewichtigen Banden, die auf eine mehrfache Phosphorylierung hindeuten, gehen nach Roscovitine- oder ZM447439-Behandlung wieder deutlich zurück.

Der Westernblot zeigte, dass die im Adriamycin-/UCN-01-Arrest auftretende Phosphorylierung von Bcl-2 nach zusätzlicher Roscovitine- oder ZM447439-Behandlung reduziert wird (Abb. 4.9). Da durch die Behandlung aber gleichzeitig der mitotische Arrest durchbrochen wird (mitotischer Index nach Roscovitine-Behandlung 9% und nach ZM447439-Behandlung 1%), kann mit diesem Experiment nicht unterschieden werden, ob es sich um einen spezifischen Effekt der Kinaseninhibierung handelt oder um einen sekundären Effekt durch den mitotischen Austritt.

4.7 Weitere Signalwege mit Einflussmöglichkeiten auf einen Mitose-assoziierten Zelltod

Es ist bekannt, dass eine antiapoptotische Survivinfunktion auch durch einen Akt-abhängigen Signalweg stimuliert werden kann (*BELYANSKAYA et al. 2005*). Dabei wird die Kinase Akt (Synonym: „PKB“) von der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch Phosphorylierung aktiviert und kann, am ehesten ebenfalls über eine Phosphorylierung an Thr34, die Stabilität von Survivin erhöhen. Zudem kann phosphoryliertes Akt das proapoptotische Protein Bad phosphorylieren und damit inhibieren. Da Akt somit über zwei Mechanismen protektive Signalwege während der Mitose unterstützen könnte, habe ich im Folgenden geprüft, ob das Konzept einer kombinierten Chemotherapie am G2/M-Übergang, auch mit dem Schema Adriamycin-/UCN-01/Akt-Inhibierung zu einer starken Caspase-3-Erhöhung führt. Zur chemischen Inhibierung der Akt-Funktion habe ich die Substanz LY294002 verwendet, welche PI3K inhibiert und zur Blockierung des PI3K/Akt-Signalweges etabliert ist (*VLAHOS et al. 1994*) (*DANGI et al. 2003*).

Eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität konnte gemessen werden, wenn LY294002 vor UCN-01 zu den mit Adriamycin-behandelten Zellen gegeben wurde (Daten nicht dargestellt). Bei dieser Behandlung konnte jedoch kein mitotischer Eintritt induziert werden, wie sich mit einer Untersuchung des Cyclin-B-Proteinspiegels zeigen ließ. Cyclin-B akkumuliert vor Beginn der Mitose, um am G2/M-Übergang CDK1 zu aktivieren. Im G2-Zellzyklus-Arrest nach Adriamycin-Behandlung war der Cyclin-B-Proteinspiegel daher deutlich erhöht (Abb. 4.10). Zellen, die wieder aus der Mitose austraten (nach ZM447439- oder Roscovitine-Behandlung), zeigten einen niedrigen Cyclin-B-Proteinspiegel, da Cyclin-B zum Mitoseaustritt abgebaut werden muss. Wie sich anhand des niedrigen Cyclin-B-Proteinspiegels in der Westernblotanalyse der Adriamycin/LY294002/UCN-01-behandelten Zellen zeigte, treten diese nicht in die Mitose ein (Abb. 4.10). Damit ist eine PI3K/Akt-Inhibierung nicht zur Kombination mit einer Adriamycin-/UCN-01-Behandlung geeignet, da die Durchbrechung des G2-Arrestes verhindert wird.

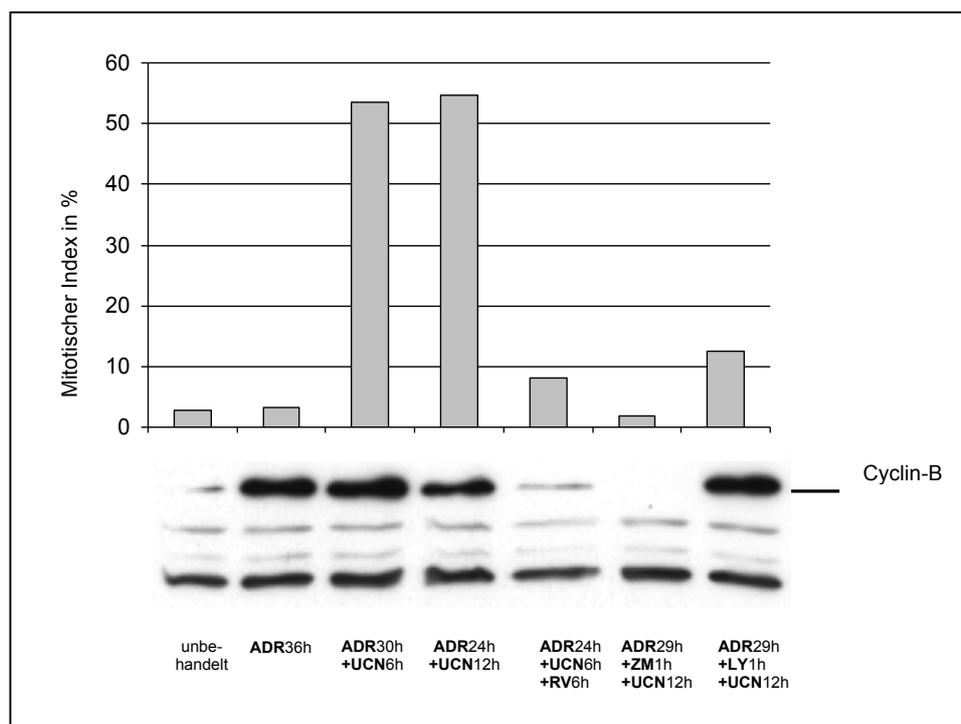


Abb. 4.10: Quantitative Bestimmung von Cyclin-B im Westernblot nach Inhibitoren-Behandlung von HeLa-Zellen. Nach 30- oder 24-stündiger Adriamycin(ADR)-Behandlung wurde UCN-01 für 6h oder 12h zugegeben. Zusätzlich wurde bei 12-stündiger UCN-01-Behandlung, 6 Stunden nach Beginn der UCN-01-Behandlung, Roscovitine (RV) und eine Stunde vor Beginn der UCN-01-Behandlung, ZM447439 (ZM) zugegeben. Ebenfalls eine Stunde vor UCN-01-Behandlung wurde LY294002 (LY) zugegeben. Nach ADR sowie ADR/UCN-01-Behandlung liegt Cyclin-B vermehrt vor, was einem hohen mitotischen Index entspricht, bzw. im Falle von ADR, der Arretierung der Zellen in G2 kurz vor der Mitose. Eine Roscovitine- oder ZM447439-Behandlung führt zur Reduktion des Cyclin-B-Proteinspiegels bei niedrigem mitotischen Index, was für einen Austritt der Zellen aus dem mitotischen Arrest spricht. Ein hoher Cyclin-B-Proteinspiegel bei niedrigem mitotischen Index nach LY294002-Behandlung ist mit einer Arretierung der Zellen in G2 vor der Mitose vereinbar.

Eine Verzögerung des G2/M-Übergangs wurde nach alleiniger LY294002-Behandlung beschrieben (*SHTIVELMAN 2003*). Die hier nach DNA-Schaden beobachtete potente Verhinderung des mitotischen Eintrittes deutet auf eine wichtige Funktion des PI3K-Signalweges für den mitotischen Eintritt nach DNA-Schaden hin, sobald das inhibierende Signal des DNA-Schaden-Kontrollpunktes aufgehoben ist.

Des Weiteren habe ich untersucht, ob der durch Adriamycin/UCN-01/RV-Behandlung eingeleitete Zelltod durch eine Kombination mit Transkriptions- oder Translationshemmern weiter verstärkt werden kann (Ergebnisse nicht dargestellt). Hierbei ergaben sich erste Hinweise darauf, dass eine Kombination mit Translationshemmern wie Cycloheximid eine Apoptoseverstärkung bewirkt und eine Kombination mit Transkriptionshemmern keinen Effekt bzw. einen leicht protektiven Effekt zeigt.

In einer anderen Untersuchung habe ich den Apoptose-verstärkenden Effekt von Roscovitine und ZM447439 bei Behandlungen getestet, die ebenfalls mit einem mitotischen Metaphasenarrest nach Zellschädigung einhergehen. Nach Behandlung mit den Spindelgiften Nocodazol oder Taxol wurde das Ausmaß des Zelltodes, gemessen an der Caspaseaktivität, ebenfalls durch eine zusätzliche Therapie mit Roscovitine oder ZM447439 verstärkt (Ergebnisse nicht dargestellt).

5 Diskussion

Apoptotische und antiapoptotische Mechanismen nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung

Eine zeitlich abgestimmte Behandlung mit Adriamycin und UCN-01 führt in HeLa-Zellen zum Eintritt in die Mitose und zur Einleitung von Zelltod, der anhand der Caspase-Aktivität oder des Sub-G1-Gehaltes in der FACS-Analyse nachvollzogen werden kann. Es konnte zudem kürzlich gezeigt werden, dass der Zelltod mit Cytochrom-c-Freisetzung aus Mitochondrien, PARP-Spaltung, Caspasenaktivierung und DNA-Zerfall einhergeht (*VOGEL et al. 2007*) und somit eine Form der Apoptose darstellt. Das Auftreten der apoptotischen Parameter ist dabei erst in mitotischen Zellen zu beobachten und spricht dafür, dass die Einleitung der Mitose durch UCN-01, die Voraussetzung für den Beginn der Apoptose ist. Des Weiteren kommt es zu einem mitotischen Arrest durch Aktivierung des Spindelkontrollpunktes, für dessen Erhalt auch die Proteine Aurora-B und Survivin notwendig sind (*VOGEL et al. 2007*).

Das Modell eines zusätzlichen antiapoptotischen Signalwegs im mitotischen Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung basiert auf den folgenden Beobachtungen. Einerseits liegen klassische Komponenten der Apoptose-Regulation in Zuständen vor, die als antiapoptotisch bekannt sind: es liegt weniger aktives Bax vor und das Protein Bcl-2 ist multi-phosphoryliert. Andererseits lässt sich die ablaufende Apoptose (gemessen an der Caspase-3-Aktivität) durch Zugabe bestimmter Inhibitoren (Roscovitine, ZM447439) um ein Vielfaches verstärken.

Für eine Beteiligung Survivins an diesem Überlebenssignalweg gibt es folgende Hinweise. Zum einen sind die Zielproteine der zwei verwendeten Inhibitoren (Roscovitine inhibiert CDK1, ZM447439 inhibiert Aurora-B) auch direkte Interaktionspartner Survivins. CDK1 kann Survivin an Threonin-34 phosphorylieren (*O'CONNOR et al. 2000*) und Aurora-B bildet als „chromosomal passenger“-Protein während der Mitose einen stabilen Komplex mit Survivin und anderen Proteinen. Zum anderen wurde in den letzten Jahren eine antiapoptotische Funktion Survivins im mitotischen Arrest nach Taxol-Behandlung nachgewiesen (*O'CONNOR et al. 2002*).

Ergänzend zu meinen Ergebnissen konnte kürzlich gezeigt werden, dass nach Survivin-Repression mittels shRNA im mitotischen Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung ebenfalls ein Caspaseanstieg zu beobachten ist (*VOGEL et al. 2007*).

Dieser ist allerdings weniger ausgeprägt als nach Roscovitine-Behandlung, was dadurch erklärt werden könnte, dass eine RNA-vermittelte Repression nicht in der Lage ist, das Protein vollständig zu eliminieren. Die Interpretation der shRNA-Methode ist jedoch schwierig, da gezeigt wurde, dass Survivin für den Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung notwendig ist. Die Transfektion der Zellen erfolgt bei dieser Methode vor der Adriamycin-/UCN-01-Behandlung und es ist nicht klar, wie der Survivin-Verlust den Ablauf der Mitose verändert. Eine indirekte Bestätigung erhält das Experiment dadurch, dass die shRNA-basierte Repression des Proteins Mad2, das ebenfalls für den mitotischen Arrest notwendig ist, nicht zu einer vergleichbaren Caspasenerhöhung führt (*VOGEL et al. 2007*).

Ein Hinweis auf eine durch Survivin/CDK1 regulierte Bcl-2-Hyperphosphorylierung und eine damit einhergehende Blockade der mitochondrialen Apoptose ist die zeitliche Korrelation. Die Bcl-2-Hyperphosphorylierung tritt bei hoher CDK1-Aktivität zum Zeitpunkt des Mitoseeintritts auf, gleichzeitig mit der Akkumulation von Survivin bei Mitoseeintritt. Die CDK1/(Survivin)-Inhibierung sowie die Aurora-B/(Survivin)-Inhibierung geht mit einer Dephosphorylierung von Bcl-2 einher (Abb. 4.9). Beide Vorgänge lassen jedoch auch die Interpretation zu, dass die Bcl-2-Hyperphosphorylierung eine unspezifische Erscheinung der Mitose ist. Für eine Verknüpfung der Signalwege wurden kürzlich weitere Hinweise gefunden (*VOGEL et al. 2007*). Es konnte gezeigt werden, dass nach shRNA vermittelter Repression von Survivin die multi-Phosphorylierung von Bcl-2 verloren geht. Auch aktives Bax war nach shRNA vermittelter Repression von Survivin wieder vermehrt nachweisbar, was sich jedoch nicht nach shRNA vermittelter Repression von Mad2 zeigte und so einen unspezifischen Effekt durch Beeinträchtigung von Spindel-, „checkpoint“-Proteinen unwahrscheinlich macht. Weiterhin führte in diesen Experimenten eine Überexpression von Bcl-2 zur Verminderung der Caspaseaktivität nach Adriamycin/UCN-01/Roscovitine-Behandlung aber nicht nach alleiniger Adriamycin-/UCN-01-Behandlung. Dies spricht dafür, dass der Anstieg der Caspaseaktivität nach Roscovitine- oder ZM447439-Behandlung in der Tat auf einer Bcl-2-abhängigen Entblockung der mitochondrialen Apoptose beruht, der geringere Anstieg der Caspaseaktivität nach alleiniger Adriamycin-/UCN-01-Behandlung jedoch nicht.

Dieses sind zusammengenommen einige Hinweise für eine Signalkette CDK1-Survivin-Bcl-2/Bax. Ein Experiment, welches die beobachteten Effekte (Caspase-3-Induktion, Verlust der Bcl-2-Phosphorylierung, Zunahme an aktivem Bax) abhängig

von einer Survivin-Inhibierung zeigt und nicht abhängig vom Mitoseaustritt konnte bisher allerdings nicht durchgeführt werden. Dies wäre durchführbar, wenn man spezifisch die apoptotische Funktion Survivins blockieren könnte, ohne seine Beteiligung am mitotischen Arrest zu beeinträchtigen. Da die Interaktion von Survivin und CDK1 auf der Phosphorylierung von Survivin an Thr34 durch CDK1 beruht (*O'CONNOR et al. 2000*), könnte man den Einfluss einer Thr34-Ala-Mutante auf die Apoptose untersuchen. Es ist beschrieben worden, dass solche Mutanten Apoptose in einer Vielzahl von Tumorzellen auslösen und unter anderem auch die Taxol-Wirkung verstärken (*O'CONNOR et al. 2000*) (*MESRI et al. 2001*). Interessant wäre zu untersuchen, ob trotz der Expression dieser Survivin-Mutante, ein stabiler mitotischer Arrest nach Taxol- oder Adriamycin-/UCN-01-Behandlung erhalten bleibt, aus dem heraus Apoptose eingeleitet wird. Dies würde gegen die Notwendigkeit des Mitoseaustrittes für die Apoptoseinduktion sprechen.

Mechanismus der Einleitung des mitotischen Arrestes nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung

Die Adriamycin-/UCN-01-Behandlung löst in HeLa-Zellen die Einleitung von Mitose bei bestehendem DNA-Schaden aus, die von einem Metaphasenarrest gefolgt wird. Es wurden kürzlich weitere Eigenschaften des Zellzyklus-Arrestes nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung beschrieben (*VOGEL et al. 2007*), die mit einer Aktivierung klassischer Spindel-, „checkpoint“-Komponenten vereinbar sind. Fluoreszenzmikroskopisch zeigen sich Charakteristika eines Metaphasen-Arrestes: eine mitotische Spindel hat sich bereits ausgebildet, die Chromosomen sind kondensiert und teilweise schon auf der Metaphasenplatte aufgereiht, die Segregation wird jedoch verhindert. Die Proteine Bub1 und BubR1 sind - typisch für einen Spindel-, „Checkpoint“-Arrest - an die Kinetochoren lokalisiert. Es konnte weiterhin mit shRNA-Technik gezeigt werden, dass die „chromosomal passenger“-Proteine Survivin und Aurora-B für den Arrest notwendig sind.

Ein solcher mitotischer Arrest bei DNA-Schaden kann auch mit anderen Behandlungen erreicht werden (*CHOW et al. 2003*) (*MIKHAILOV et al. 2002*). Die Aufklärung der Mechanismen, wie DNA-Schaden den Spindelkontrollpunkt aktivieren kann, ist Gegenstand aktueller Forschung (*KIM et al. 2008*) und es wurden dazu verschiedene Konzepte entwickelt. Sie beschreiben vor allem die Entstehung des arreterenden Signals unterschiedlich und sind sich zu großen Teilen darin einig, dass

am Ende der Signaltransduktion klassische Spindel-, „checkpoint“-Proteine aktiviert werden.

Als Signalgeber für die Aktivierung des Spindel-, „checkpoint“-s stellt ein Konzept die Kinetochorfunktion in den Vordergrund. Indem der DNA-Schaden in mindestens einem Chromosom auch die Zentromer-Region betrifft, wird eine erfolgreiche Anbringung dieses Chromosoms an die Spindel verhindert und damit der Spindel-, „checkpoint“ aktiviert (*MIKHAILOV et al. 2002*). Weitere Experimente konnten die Abhängigkeit eines mitotischen Arrestes nach DNA-Schaden von Mad2 oder BubR1 bestätigen (*FANG et al. 2006*) (*ROYOU et al. 2005*) und so die Beteiligung des Spindel-, „checkpoint“-Mechanismus zeigen.

Ein anderes Konzept schlägt vor, dass Bestandteile der DNA-Schaden-Signalwege in G2 auch in der Mitose aktiv sind und Kinasen wie ATM, ATR, CHK1 direkt mit Spindel-, „checkpoint“-Proteinen interagieren könnten (*KIM et al. 2008*). Interessanterweise wurde kürzlich entdeckt, dass Kinasen der PIKK-Familie (wozu ATM und ATR gehören) einige Spindel-, „checkpoint“-Proteine wie Bub1 und Mad2 als Reaktion auf DNA-Schaden direkt phosphorylieren können (*MATSUOKA et al. 2007*). Alternativ wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der nicht direkt mit dem Spindel-, „checkpoint“ kommuniziert, sondern über ATM/ATR zentrosomale Proteine beeinflusst und so zu einer Störung des Spindelaufbaus führt (*SMITH et al. 2009*).

Die Methode der hier angewendeten Adriamycin-/UCN-01-Behandlung schließt eine notwendige CHK1-Beteiligung am mitotischen Arrest aus, da die Kinase vor Eintritt in die Mitose inhibiert wird. Um die Bedeutung von DNA-Schaden-Signalwegen für die Einleitung des mitotischen Arrestes weiter zu überprüfen, wäre es interessant im mitotischen Arrest mit spezifischen Kinaseinhibitoren auch andere Komponenten von DNA-Schaden-Signalwegen wie ATM, ATR oder CHK2 selektiv zu inhibieren. Damit könnte untersucht werden, ob sie an der Aktivierung des Spindelkontrollpunktes nach DNA-Schädigung beteiligt sind.

Die von mir beobachtete Zunahme der H2AX-Phosphorylierung im mitotischen Arrest, ist sowohl mit dem Kinetochor-Konzept als auch mit dem Konzept über die Beteiligung von DNA-Schaden-Signalwegen vereinbar. Die mechanischen Kräfte des Spindelapparates auf die chromosomale DNA in der Mitose könnten zusätzliche Doppelstrangbrüche – einhergehend mit vermehrtem Signal für phosphoryliertes H2AX (γ -H2AX) – in die vorgeschädigte DNA einfügen und so die

Wahrscheinlichkeit für DNA-Schädigung in Kinetochornähe erhöhen. Andererseits könnte die Ausbreitung des γ -H2AX-Signals für eine vermehrte Aktivität der DNA-Schaden-Signalwege sprechen.

Die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX ist ein etablierter Bestandteil des zellulären Reparatur-Systems für Doppelstrangbrüche. Es dient hierbei zur Chromatinmodifikation sowie Rekrutierung von Reparaturfaktoren und ein Verlust der Modifikation führt zu erhöhter Radiosensitivität (*KINNER et al. 2008*). Das Phosphorylierungsausmaß korreliert mit der Zahl der bestehenden Doppelstrangbrüche (*ROGAKOU et al. 1998*) und ein Einsatz als Biomarker für die Beurteilung der Effizienz von Radio- und Chemotherapien wird diskutiert (*DICKEY et al. 2009*). Alle Kinasen der PIKK-Familie können H2AX phosphorylieren, wobei ATM wahrscheinlich physiologisch die größte Bedeutung zukommt. Die H2AX-Phosphorylierung entwickelt sich PIKK-abhängig zu beiden Seiten eines Doppelstrangbruches auf einer Länge von bis zu über einem Megabasenpaar. Eine Zunahme der H2AX-Phosphorylierung nach mitotischem Eintritt kann daher auf eine Zunahme an Doppelstrangbrüchen oder eine Ausbreitung des γ -H2AX-Signals pro Doppelstrangbruch zum Beispiel aufgrund verstärkter ATM-Aktivität oder Chromatinveränderungen im Rahmen der Mitoseeinleitung hindeuten.

Ist die Zunahme an γ -H2AX nur eine Nebenerscheinung der UCN-01-Behandlung oder tritt sie im Rahmen der eingeleiteten Apoptose auf ?

Es wurde beschrieben, dass eine UCN-01-Behandlung H2AX-Phosphorylierung auslöst, indem es durch die CHK1-Inhibierung in der S-Phase zur übermäßigen Replikationsaktivität mit ATR-Überaktivität und folgender Phosphorylierung von H2AX sowie Entstehung von Doppelstrangbrüchen kommt (*SYLJUASEN et al. 2005*). Zum Zeitpunkt meiner Behandlung finden sich aber über 95% der Zellen mit bereits duplizierten Chromosomen im G2-Zellzyklus-Arrest. Eine Wirkung der CHK1-Inhibierung auf die Replikation als Erklärung ist daher ausgeschlossen. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass auch Zellen, die nur mit DNA-schädigenden Stoffen behandelt wurden und dem G2-Arrest entkommen (adaptieren), eine vergleichbare Zunahme der H2AX-Phosphorylierung zeigen wie Zellen, die mit UCN-01 behandelt wurden (*VARMARK et al. 2009*). Dies spricht dafür, dass DNA-Schaden in der Mitose ausreicht, um das Signal der H2AX-Phosphorylierung zu verstärken und dies keine spezifische Erscheinung der UCN-01-Behandlung ist.

Es ist auch möglich, dass die Phosphorylierung von H2AX als Merkmal apoptotischer Zellen auftritt, die während des mitotischen Zelltodes entstehen. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass H2AX im Zuge der apoptotischen DNA-Fragmentierung phosphoryliert wird (*ROGAKOU et al. 2000*), was als Nebeneffekt der entstehenden Doppelstrangbrüche aufgefasst werden kann. Es mehren sich neuerdings aber Hinweise, dass γ -H2AX eine aktivere Rolle in der apoptotischen DNA-Fragmentierung spielt. Es wurde einerseits beschrieben, dass auch Kinasen wie JNK und p38, die nicht zur PIKK-Familie gehören und für ihre Beteiligung an Apoptose-Signalwegen bekannt sind, H2AX phosphorylieren können (*LU et al. 2006*) (*LU et al. 2008*). Andererseits wurde eine vermehrte H2AX-Phosphorylierung nach Apoptoseinduktion in perinukleärem Chromatin entdeckt, die völlig untypisch für die nach DNA-Schaden beobachtete Verteilung von phosphoryliertem H2AX ist (*SOLIER et al. 2009*). Besonders spannend in diesem Zusammenhang sind Ergebnisse, die eine weitere Phosphorylierung (Tyr142) an H2AX als mögliches Signal beschreiben, welches über die Akkumulation von apoptotischen Faktoren (Tyr142 phosphoryliert) oder Reparaturfaktoren (Tyr142 dephosphoryliert) entscheidet (*COOK et al. 2009*).

Die Behandlung mit Adriamycin/UCN-01 ermöglicht einen stabilen mitotischen Arrest in Gegenwart von DNA-Schaden und ist damit geeignet die Einflüsse von DNA-Schaden in der Mitose zu untersuchen. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass ein mitotischer Arrest nicht durch Signalwege eingeleitet werden muss, die direkt die Spindel schädigen (z.B. Nocodazol-Behandlung und darauf folgende DNA-Schädigung) und damit die Beurteilung erschweren, welche Behandlung in welchem Ausmaß zum Arrest beiträgt. Ein Nachteil ist, dass DNA-Schaden-Signalwege schon in G2 aktiviert wurden und keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Signalwege spezifisch der mitotischen Zelle zur Verfügung stehen, um auf DNA-Schaden zu reagieren.

Bedeutung der Phosphorylierung von Bcl-2 nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung

Meine Ergebnisse haben eine zeitliche Korrelation gezeigt, zwischen einerseits einer Bcl-2-Phosphorylierung und Bax-Inaktivierung, begleitet von schwacher Apoptose, und andererseits einer Bcl-2-Dephosphorylierung nach CDK1-Inhibierung, begleitet von starker Apoptose. Bisher haben Untersuchungen gezeigt, dass die

Phosphorylierung von Bcl-2 meistens in einer „flexible-loop-domain“ (FLD) - teilweise als multi-Phosphorylierung an mehreren Serin/Threonin-Resten - erfolgt, jedoch ohne die Bedeutung dieser Modifikation für die antiapoptotische Funktion widerspruchsfrei aufklären zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung die Stabilität des Proteins erhöht, indem sie es vor proteasomalem Abbau schützt, (*BREITSCHOPF et al. 2000*) (*BRICHESE et al. 2002*) und dass phosphomimetische Glutamat-Mutationen von drei klassischen Phosphorylierungsstellen zu verstärkter antiapoptotischer Aktivität des Proteins führen (*DENG et al. 2004*). Dies sind Hinweise auf eine gestärkte antiapoptotische Funktion des Proteins im Zustand der multiplen Phosphorylierung. Andererseits führt eine nicht-phosphorylierbare Alanin-Mutation der entsprechenden Reste ebenfalls zur Stärkung der antiapoptotischen Funktion (*YAMAMOTO et al. 1999*), ebenso wie eine komplette Deletion der entsprechenden Region (*SRIVASTAVA et al. 1999*). Beides spricht für eine geschwächte antiapoptotische Funktion im phosphorylierten Zustand.

Nach Taxol-Behandlung kommt es zu einem mitotischen Arrest in dem eine Phosphorylierung von Bcl-2 und Einleitung von Apoptose beobachtet wurde, was zum Anlass genommen wurde der Phosphorylierung eine proapoptotische Funktion zu zuschreiben (*SRIVASTAVA et al. 1998*). Dies steht im Kontrast zu der von mir beobachteten Bax-Inaktivierung im Zellzyklus-Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung, die eher für eine antiapoptotische Regulation oberhalb des Mitochondriums, trotz eingeleiteter Apoptose, spricht. Und dieses Konzept einer abgeschwächten Apoptose wird durch die Beobachtung gestützt, mit bestimmten Behandlungen (Roscovitine, ZM447439, shBcl-2) eine vielfach stärkere Apoptose einleiten zu können.

Sollte die Regulation der Apoptose durch Bcl-2-Phosphorylierung auf einer veränderten Interaktion mit Bax beruhen, so sollte sich das Bindungsverhalten der beiden Proteine nach Phosphorylierung verändern. Auch hierzu wurden in Koimmunopräzipitationsexperimenten widersprüchliche Ergebnisse gefunden. (*HALDAR et al. 1996*) beschreibt eine verminderte Bax-Dimerisierung nach Taxol-Behandlung, wohingegen (*SCATENA et al. 1998*) nachweist, dass multi-phosphoryliertes Bcl-2, im durch Taxol eingeleiteten Zellzyklus-Arrest, weiterhin mit Bax dimerisieren kann. Ein Koimmunopräzipitationsexperiment könnte auch im Zellzyklus-Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung durchgeführt werden, um zu klären, ob die Phosphorylierung von Bcl-2 für die Inaktivierung von Bax verantwortlich ist.

Die Schwierigkeit die Bedeutung der Phosphorylierung zu klären liegt darin, dass einerseits viele Phosphorylierungsstellen in der FLD von Bcl-2 existieren (T56, T69, S70, T74, T79, S87), die evtl. verschiedenen Funktionen erfüllen, und andererseits verschiedenen Subgruppen von Bcl-2 in verschiedenen Kompartimenten der Zelle existieren, die unterschiedlichen Phosphorylierungen unterworfen sind (*BARBOULE et al. 2005*). Je nach Zelltyp und Behandlung könnte die Phosphorylierungsstelle und Subgruppe variieren.

Da im Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signalwege aktiv sind, ist die Funktion der Bcl-2-Phosphorylierung in diesem Kontext schwer einzuordnen. Das verminderte Vorliegen von aktiviertem Bax ist ein Hinweis auf eine antiapoptotische Funktion von phosphoryliertem Bcl-2. Die kürzlich gemachten Beobachtungen, dass eine Bcl-2-Überexpression den, durch Adriamycin-/UCN-01 eingeleiteten, Zelltod nicht vermindern kann, wohl aber den Zelltod nach Adriamycin-/UCN-01/Roscovitine, der mit einer Dephosphorylierung von Bcl-2 einhergeht (*VOGEL et al. 2007*), unterstützen dieses Konzept.

Ebenso wie über die Funktion der Phosphorylierung von Bcl-2, gibt es auch über die phosphorylierende Kinase noch keine Einigkeit. An den verschiedenen potentiellen Phosphorylierungsstellen des Proteins wurden Erkennungssequenzen einiger Kinasen entdeckt, darunter PKB, PKC, MAP, Erk1/2 (*BREITSCHOPF et al. 2000*) und CDK1 (*FURUKAWA et al. 2000*). Es konnte eine *in-vitro*-Assoziation von CDK1 und Bcl-2 gezeigt werden (*PATHAN et al. 2001*) sowie eine *in-vitro*-Phosphorylierung von Bcl-2 durch CDK1 (*FURUKAWA et al. 2000*) (*LING et al. 1998*). In anderen Untersuchungen konnte eine *in-vitro*-Phosphorylierung jedoch nicht nachgewiesen werden (*SCATENA et al. 1998*). Diese Unklarheit ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass eine Phosphorylierung durch CDK1 nur mit Kofaktoren möglich ist. Einigkeit gibt es über die Feststellung, dass die Kinase während der Mitose aktiv ist (*BLAGOSKLONNY 2001*). Es wurde kürzlich gezeigt, dass Plk1, nach Behandlung mit einem Mikrotubuli-Hemmstoff, Bcl-XL phosphoryliert (*TAMURA et al. 2009*). Da Bcl-2 und Bcl-XL während der Mitose und nach Mikrotubuli-Hemmstoff-Behandlung ein ähnliches Phosphorylierungsmuster aufweisen, (*DU et al. 2005*) könnte vielleicht auch zwischen Bcl-2 und der Familie der Polokinasen eine ähnliche Verbindung bestehen.

Es wurde beobachtet, dass während einer normalen Mitose Bcl-2 nur einfach phosphoryliert wird und im mitotischen Arrest nach Spindelinhibitoren bis zu dreimal (*DU et al. 2004*). Meine Beobachtung, dass im Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung ebenfalls eine Multi-Phosphorylierung zu sehen ist, spricht dafür, dass dies kein Nebeneffekt von Spindelinhibitoren oder einer einfachen Mitose ist, sondern mit der Aktivierung des Spindel-„checkpoints“ unabhängig vom auslösenden Mechanismus verbunden zu sein scheint.

Zunahme des Zelltodes durch Hemmung von CDK1 oder Aurora-B

Kombiniert man die Adriamycin-/UCN-01-Behandlung mit Roscovitine oder ZM447439, kommt es zu einer starken Erhöhung der Caspase-3-Aktivität sowie einer Bcl-2-Dephosphorylierung und gleichzeitig zum Durchbruch des mitotischen Arrestes und Eintritt in die G1-Phase. Es gibt Hinweise, dass für die Einleitung dieses Zelltodes auch die Dephosphorylierung von Survivin-T34 von Bedeutung ist (s.o.). Es konnte jedoch in keinem Experiment sicher gezeigt werden, dass eine Dephosphorylierung von Survivin-T34 oder Bcl-2 den gleichen Caspase-3-Effekt auch ohne mitotischen Austritt einleitet. Die Roscovitine- oder ZM447439-Behandlung reduziert den mitotischen Index auf 1-10%.

Vor kurzem wurde ein Mechanismus beschrieben, der die zum mitotischen Austritt notwendige Verminderung der CDK1-Aktivität direkt mit Apoptoseeinleitung in Verbindung bringt. Demnach wird Caspase-9 während der Mitose durch Interaktion mit CDK1 und Phosphorylierung durch CDK1 an Thr125 inaktiv gehalten (*ALLAN et al. 2009*). Die langsam fortschreitende Inaktivierung von CDK1 durch Cyclin-B-Abbau, im mitotischen Arrest nach Behandlung mit Spindelinhibitoren (Nocodazol, Taxol), soll über diesen Mechanismus für die Apoptoseeinleitung verantwortlich sein, die mit zunehmender Arrestlänge beobachtet wird (*ALLAN et al. 2007*). Auch im mitotischen Arrest nach Adriamycin-/UCN-01-Behandlung scheint es zu einem langsamen Cyclin-B Abbau zu kommen (Abb. 4.10). Da eine häufige Erklärung der antiapoptotischen Wirkung Survivins die Stärkung der XIAP-Caspase-9-Interaktion ist (*DOHI et al. 2004*), könnte eine CDK1-Inhibierung gleich mit zwei Mechanismen Apoptose entlocken: Deblockierung von Caspase-9 und Schwächung von Caspase-9-Inhibitoren wie XIAP durch Dephosphorylierung von Survivin-T34.

Beide Signalwege würden aber unterhalb des Mitochondriums münden, wohingegen die Ergebnisse dieser Arbeit und andere Ergebnisse (*VOGEL et al. 2007*) für eine

Beteiligung des mitochondrialen Apoptoseweges nach Roscovitine-Behandlung, eventuell über eine Dephosphorylierung von Bcl-2 und Reaktivierung von Bax, sprechen. CDK1-Inhibierung muss demnach mehr bewirken, als die Entblockung von Caspase-9. Das Caspase-9-Modell erklärt nicht die Beteiligung der mitochondrialen Apoptose. Es wäre allerdings interessant auch die Apoptose nach Adriamycin/UCN-01+Roscovitine/ZM447439-Behandlung auf eine Beteiligung von Caspase-9 hin zu überprüfen.

Unabhängig von dem Caspase-9-Modell könnte es andere Apoptose-Mechanismen geben, die durch den mitotischen Austritt eingeleitet werden, ohne dass dabei Dephosphorylierung von Survivin-T34 und Bcl-2 von Bedeutung sind. Es wäre wünschenswert, spezifisch die apoptotische Funktion Survivins blockieren zu können, ohne seine Beteiligung am mitotischen Arrest zu beeinträchtigen. Damit könnte die Bedeutung des mitotischen Austrittes für die Einleitung von Apoptose nach Adriamycin/UCN-01+Roscovitine/ZM447439-Behandlung besser beurteilt werden.

Verzögerung des Mitoseintrittes trotz UCN-01-Behandlung

Ich konnte zeigen, dass eine LY294002-Behandlung von durch Adriamycin-Behandlung in G2 arretierten HeLa-Zellen, trotz nachfolgender Behandlung mit UCN-01, den Eintritt in die Mitose verhindert (Abb. 4.10). Unter anderen Bedingungen ist eine Verzögerung des G2/M-Überganges in der Literatur beschrieben worden. Eine erste Beobachtung zu einer G2/M-Verzögerung durch PI3K/PKB-Inhibierung vermutete eine Aktivierung von CHK1 als zentralen Mechanismus (*SHTIVELMAN et al. 2002*). Dies kann unter meinen Versuchsbedingungen nicht der zentrale Mechanismus sein, da CHK1 durch UCN-01 inhibiert wird. Des Weiteren wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, demzufolge PKB (= Synonym „Akt“) die Ubiquitin-Ligase CHFR phosphoryliert und inhibiert. CHFR ist am Abbau der Kinasen Plk1 (*SHTIVELMAN 2003*) und Aurora-A (*YU et al. 2005*) (*LIU et al. 2008*) beteiligt. Demzufolge erhöht PKB den Proteinspiegel bzw. die Aktivität dieser beiden Kinasen am G2/M-Übergang. Zusätzlich wurde eine direkte Stimulierung der Promoteraktivität von Aurora-A durch PKB gezeigt (*LIU et al. 2008*). Eine PKB-Inhibierung kann somit über verschiedene Mechanismen die Aktivität von Plk1/Aurora-A am G2/M-Übergang reduzieren. Da diese beiden Kinasen über verschiedene Mechanismen an der CDK1/Cyclin-B-Aktivierung und damit dem Eintritt in die Mitose beteiligt sind (*LINDQVIST et al. 2009*), ist dieser Mechanismus plausibel.

Fraglich bleibt, wieso PI3K-Inhibierung nach DNA-Schaden, wie in meinen Experimenten, einen stabilen Arrest erzeugt, der nicht durch CHK1-Inhibierung zu durchbrechen ist, während bei unbehandelten Zellen nur eine Verzögerung des mitotischen Eintrittes zu beobachten ist (ROBERTS *et al.* 2002). Diesbezüglich wurde die Beobachtung gemacht, dass Plk1-Aktivierung nach DNA-Schaden essentiell ist, um den mitotischen Eintritt zu ermöglichen (VAN VUGT *et al.* 2004). Ein möglicher Mechanismus könnte darin bestehen, dass nach DNA-Schaden die Balance zwischen den teilweise untereinander redundanten Phosphatasen Cdc25A/B/C und den CDK1-Inhibitoren Wee1/Myt1 zugunsten Letzterer verschoben ist (VAN VUGT *et al.* 2004). Hiermit könnte die Cdc25C-Aktivierung durch Plk1 (SMITS *et al.* 2000) bzw. die Wee1-Inaktivierung durch Plk1 notwendig werden, um CDK1-Cyclin-B zu aktivieren. Außerdem wurde gezeigt, dass Aurora-A für die Aktivierung von Plk1 notwendig ist (MACUREK *et al.* 2008) und dass die Kinaseaktivität von Aurora-A nach DNA-Schaden vermindert ist, obwohl das Protein im G2-Zellzyklus-Arrest akkumuliert (KRYSTYNIAK *et al.* 2006). Denkbar ist, dass eine Signaltransduktion über Aurora-A-Plk1-CDK1 zum Mitoseeintritt durch verschiedene Mechanismen eingeleitet werden kann. Nach DNA-Schaden könnte einer dieser Mechanismen ausgeschaltet werden und die Aktivierung damit von einem weiteren sonst redundanten Aktivierungsmechanismus über PI3K-PKB abhängig werden.

Meine Beobachtung, dass PI3K-Inhibierung auch bei paralleler CHK1-Inhibierung in der Lage ist, einen stabilen G2-Arrest nach DNA-Schaden einzuleiten, kann für eine kombinierte Chemotherapie: DNA-schädigender Stoff + G2-Kontrollpunkt-Hemmstoff (+ CDK1-Inhibitor) Bedeutung erlangen. Inaktivierende Mutationen im PI3K-PKB-CHFR-Plk1/Aurora-A-Signalweg könnten zu Resistenz des Tumors gegenüber einer solchen Therapie beitragen, indem sie den Eintritt in die Mitose verhindern. Mutationen im PI3K-PKB-Signalweg sowie des *Aurora-A*- und *Plk1*-Gens finden sich in der Tat in vielen Tumoren (MACUREK *et al.* 2009).

Ausblick

Das Prinzip der Durchbrechung des G2-Zellzyklus-Arrestes verspricht eine Wirkungsverstärkung einer DNA-schädigenden Chemotherapie bei Tumorspezifität für Zellen mit gestörter p53-Funktion. Ich habe an HeLa-Zellen gezeigt, dass der durch Mitoseeintritt eingeleitete Zelltod, durch antiapoptotische Mechanismen begrenzt wird und durch Manipulation von mitotischen Signalwegen weiter verstärkt werden kann. Das sequentielle Schema: DNA-Schaden (Adriamycin) + CHK1-Inhibierung (UCN-01) + CDK1-Inhibierung (Roscovitine) führt dabei zu einer besonders hohen Caspase-3-Aktivierung. Als Alternative zu Roscovitine in diesem Schema wurden kürzlich Experimente mit anderen CDK1-Inhibitoren durchgeführt, die einen ähnlichen Effekt zeigten (*VOGEL et al. 2007*) (und nicht publizierte Daten). Als nächster Schritt sollte das Schema an anderen Tumorzelllinien mit gestörter p53-Funktion überprüft werden sowie zur Einschätzung von Nebenwirkungen an nicht-malignen Zellen.

DNA-schädigende Therapeutika wie Adriamycin sind klinisch erprobt und seit langer Zeit in therapeutischer Anwendung. UCN-01 hat in klinischen Studien eine ungünstige Pharmakokinetik gezeigt, einige alternative CHK1-Inhibitoren sind aber in der Erforschung und teilweise schon in klinische Studien eingebunden (siehe Einleitung). An CDK1-Inhibitoren wird aufgrund vielfacher Anwendungsmöglichkeiten ebenfalls intensiv geforscht und zahlreiche Inhibitoren finden sich in der klinischen Erprobung (*SHAPIRO 2006*). Alternativ zur CDK1-Inhibierung kann möglicherweise Survivin direkt bzw. können seine Interaktionen mit ausgewählten Proteinen inhibiert werden (*ALTIERI 2003*).

Wird ein durch Taxol-Behandlung hervorgerufener mitotischer Arrest mit einem CDK1-Inhibitor kombiniert, erfolgt ebenfalls eine starke Caspase-3-Aktivierung. Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt auf der Dephosphorylierung von Survivin-T34 beruht, wodurch ein Survivin-abhängiger antiapoptotischer Signalweg durchbrochen wird. Möglicherweise beruht die Apoptoseinduktion nach Taxol/Roscovitine-Behandlung und Adriamycin/UCN-01/Roscovitine-Behandlung auf ähnlichen Mechanismen womit die weitere Erforschung der Grundlagen einer CDK1-/Survivin-Hemmung sowohl Chemotherapien mit Spindelinhhibitoren als auch DNA-schädigenden Stoffen zu Gute kommen würde. Zudem wurden in den letzten Jahren neue Mechanismen der Mitoseregulation entdeckt, deren Hemmung ebenfalls zu einem mitotischen Arrest oder fehlerhaften Mitosen führt (*SCHMIDT et al. 2007*). Auch eine

Kombination einer allgemeinen antimitotisch wirksamen Therapie mit CDK1-/Survivin-Inhibierung könnte daher viel versprechend sein.

Mit dem Schema Adriamycin/UCN-01/Roscovitine kann man möglicherweise Resistenzen gegen DNA-schädigende Stoffe in Form einer p53-Unterfunktion umgehen. Aber auch neue Resistenzen gegen dieses verbesserte Schema sind denkbar. Die beschriebene Verringerung der Caspase-3-Aktivität nach Bcl-2-Überexpression (*VOGEL et al. 2007*) sowie eine Verstärkung des G2-Kontrollpunktes durch andere Signalwege stellen zwei mögliche Mechanismen der Resistenzbildung dar. Die Bcl-2-Überexpression scheint auch bei der Resistenzbildung gegen Taxol-Behandlung von Bedeutung zu sein (*KUTUK et al. 2008*) und an Gegenstrategien mit Bcl-2-Inhibitoren wird geforscht (*KANG et al. 2009*).

Ein Vorbehalt muss jedoch bei jeder Form der Mitosemanipulation beachtet werden, insbesondere bei Interaktion mit dem Spindelkontrollpunkt: Fehlerhafte Mitosen können zu Aneuploidie (und Endoreduplikation) führen und diese wird mit der Entstehung von Sekundärtumoren in Verbindung gebracht. Für Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung und einer Lebenserwartung von einigen Monaten haben diese Einschränkungen wenig Relevanz. Bei möglichen kurativen Ansätzen muss man sich dieser Risiken jedoch bewusst sein.

In Bezug auf therapieresistente Tumoren, könnte das genaue Verständnis von Mitose-assoziierten Zelltodsignalwegen zu einer Wirkverstärkung klassischer Chemotherapeutika wie Spindelgiften und DNA-schädigenden Stoffen führen sowie zur Umgehung von Resistenzen.

6 Literaturverzeichnis

- ALLAN, Lindsey A. ; CLARKE, Paul R.: Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *In: FEBS J* 276 (2009) Nr. 21, S. 6063-73
- ALLAN, Lindsey A. ; CLARKE, Paul R.: Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *In: Mol Cell* 26 (2007) Nr. 2, S. 301-10
- ALTIERI, D. C.: New wirings in the survivin networks. *In: Oncogene* 27 (2008a) Nr. 48, S. 6276-84
- ALTIERI, Dario C.: Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *In: Nat Rev Cancer* 8 (2008b) Nr. 1, S. 61-70
- ALTIERI, Dario C.: Validating survivin as a cancer therapeutic target. *In: Nat Rev Cancer* 3 (2003) Nr. 1, S. 46-54
- AMBROSINI, G. ; ADIDA, C. ; ALTIERI, D. C.: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *In: Nat Med* 3 (1997) Nr. 8, S. 917-21
- BARBOULE, Nadia ; TRUCHET, Isabelle ; VALETTE, Annie: Localization of phosphorylated forms of Bcl-2 in mitosis: co-localization with Ki-67 and nucleolin in nuclear structures and on mitotic chromosomes. *In: Cell Cycle* 4 (2005) Nr. 4, S. 590-6
- BECKER, Markus et al.: Centromere localization of INCENP-Aurora B is sufficient to support spindle checkpoint function. *In: Cell Cycle* 9 (2010) Nr. 7, S. 1360-72
- BELYANSKAYA, Larisa L. et al.: Cisplatin activates Akt in small cell lung cancer cells and attenuates apoptosis by survivin upregulation. *In: Int J Cancer* 117 (2005) Nr. 5, S. 755-63
- BLAGOSKLONNY, M. V.: Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *In: Leukemia* 15 (2001) Nr. 6, S. 869-74
- BLASINA, Alessandra et al.: Breaching the DNA damage checkpoint via PF-00477736, a novel small-molecule inhibitor of checkpoint kinase 1. *In: Mol Cancer Ther* 7 (2008) Nr. 8, S. 2394-404
- BREITSCHOPF, K. et al.: Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *In: Mol Cell Biol* 20 (2000) Nr. 5, S. 1886-96
- BRICHESE, L. et al.: Bcl-2 phosphorylation and proteasome-dependent degradation induced by paclitaxel treatment: consequences on sensitivity of isolated mitochondria to Bid. *In: Exp Cell Res* 278 (2002) Nr. 1, S. 101-11
- BUNCH, R. T. ; EASTMAN, A.: Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor. *In: Clin Cancer Res* 2 (1996) Nr. 5, S. 791-7
- BUSBY, E. C. et al.: The radiosensitizing agent 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibits the DNA damage checkpoint kinase hChk1. *In: Cancer Res* 60 (2000) Nr. 8, S. 2108-12
- CASTEDO, Maria et al.: Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *In: Oncogene* 23 (2004) Nr. 25, S. 4362-70
- CHABNER, Bruce A. ; ROBERTS, Thomas G. Jr: Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *In: Nat Rev Cancer* 5 (2005) Nr. 1, S. 65-72
- CHEN, Zehan et al.: Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *In: Mol Cancer Ther* 2 (2003) Nr. 6, S. 543-8

- CHIPUK, Jerry E. et al.: Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *In: Science* 303 (2004) Nr. 5660, S. 1010-4
- CHOW, Jeremy P. H. et al.: DNA damage during the spindle-assembly checkpoint degrades CDC25A, inhibits cyclin-CDC2 complexes, and reverses cells to interphase (clone). *In: Mol Biol Cell* 14 (2003) Nr. 10,
- CLARKE, Paul R. ; ALLAN, Lindsey A.: Cell-cycle control in the face of damage--a matter of life or death. *In: Trends Cell Biol* 19 (2009) Nr. 3, S. 89-98
- CLASSON, Marie ; HARLOW, Ed: The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *In: Nat Rev Cancer* 2 (2002) Nr. 12, S. 910-7
- COOK, Peter J. et al.: Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *In: Nature* 458 (2009) Nr. 7238, S. 591-6
- DANGI, Surabhi ; CHA, Hyukjin ; SHAPIRO, Paul: Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase activity during progression through S-phase and entry into mitosis. *In: Cell Signal* 15 (2003) Nr. 7, S. 667-75
- DEEP, Gagan ; AGARWAL, Rajesh: New combination therapies with cell-cycle agents. *In: Curr Opin Investig Drugs* 9 (2008) Nr. 6, S. 591-604
- DENG, Xingming et al.: Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) Nr. 1, S. 153-8
- DEVERAUX, Q. L. ; REED, J. C.: IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *In: Genes Dev* 13 (1999) Nr. 3, S. 239-52
- DEY, A. ; VERMA, C. S. ; LANE, D. P.: Updates on p53: modulation of p53 degradation as a therapeutic approach. *In: Br J Cancer* 98 (2008) Nr. 1, S. 4-8
- DICKEY, Jennifer S. et al.: H2AX: functional roles and potential applications. *In: Chromosoma* 118 (2009) Nr. 6, S. 683-92
- DITCHFIELD, Claire et al.: Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *In: J Cell Biol* 161 (2003) Nr. 2, S. 267-80
- DOHI, Takehiko et al.: Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *In: J Clin Invest* 114 (2004) Nr. 8, S. 1117-27
- DONZELLI, Maddalena ; DRAETTA, Giulio F.: Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *In: EMBO Rep* 4 (2003) Nr. 7, S. 671-7
- DRUKER, Brian J.: STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *In: Trends Mol Med* 8 (2002) Nr. 4 Suppl, S. S14-8
- DU, Lihua ; LYLE, Christopher S. ; CHAMBERS, Timothy C.: Characterization of vinblastine-induced Bcl-xL and Bcl-2 phosphorylation: evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/dephosphorylation cycle associated with apoptosis induction. *In: Oncogene* 24 (2005) Nr. 1, S. 107-17
- DU, Lihua et al.: Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *In: J Biol Chem* 279 (2004) Nr. 12, S. 11957-66
- ECKELMAN, Brendan P. ; SALVESEN, Guy S. ; SCOTT, Fiona L.: Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *In: EMBO Rep* 7 (2006) Nr. 10, S. 988-94
- ENARI, M. et al.: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *In: Nature* 391 (1998) Nr. 6662, S. 43-50

- FANG, Y. et al.: BubR1 is involved in regulation of DNA damage responses. *In: Oncogene* 25 (2006) Nr. 25, S. 3598-605
- FURUKAWA, Y. et al.: Phosphorylation of Bcl-2 protein by CDC2 kinase during G2/M phases and its role in cell cycle regulation. *In: J Biol Chem* 275 (2000) Nr. 28, S. 21661-7
- GABRIELLI, Brian ; BROOKS, Kelly ; PAVEY, Sandra: *Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies*. 2012.
- GASCOIGNE, Karen E. ; TAYLOR, Stephen S.: How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *In: J Cell Sci* 122 (2009) Nr. Pt 15, S. 2579-85
- GAUDIN, D. ; YIELDING, K. L.: Response of a 'resistant' plasmacytoma to alkylating agents and x-ray in combination with the 'excision' repair inhibitors caffeine and chloroquine. *In: Proc Soc Exp Biol Med* 131 (1969) Nr. 4, S. 1413-6
- GRAVES, P. R. et al.: The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *In: J Biol Chem* 275 (2000) Nr. 8, S. 5600-5
- GREEN, Douglas R. ; KROEMER, Guido: The pathophysiology of mitochondrial cell death. *In: Science* 305 (2004) Nr. 5684, S. 626-9
- HABU, Toshiyuki et al.: Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *In: EMBO J* 21 (2002) Nr. 23, S. 6419-28
- HALDAR, S. ; CHINTAPALLI, J. ; CROCE, C. M.: Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *In: Cancer Res* 56 (1996) Nr. 6, S. 1253-5
- HANAHAN, D. ; WEINBERG, R. A.: *The hallmarks of cancer*. 2000.
- HO, Chui Chui et al.: The relative contribution of CHK1 and CHK2 to Adriamycin-induced checkpoint. *In: Exp Cell Res* 304 (2005) Nr. 1, S. 1-15
- HOLLAND, Andrew J. ; CLEVELAND, Don W.: Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *In: Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2009) Nr. 7, S. 478-87
- HURLEY, Laurence H.: DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *In: Nat Rev Cancer* 2 (2002) Nr. 3, S. 188-200
- JACKSON, Jeffrey R. et al.: Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *In: Nat Rev Cancer* 7 (2007) Nr. 2, S. 107-17
- KANG, Min H. ; REYNOLDS, C. Patrick: Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *In: Clin Cancer Res* 15 (2009) Nr. 4, S. 1126-32
- KASTAN, Michael B. ; BARTEK, Jiri: Cell-cycle checkpoints and cancer. *In: Nature* 432 (2004) Nr. 7015, S. 316-23
- KERR, J. F. ; WYLLIE, A. H. ; CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *In: Br J Cancer* 26 (1972) Nr. 4, S. 239-57
- KIM, Eun Mi ; BURKE, Daniel J.: DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *In: PLoS Genet* 4 (2008) Nr. 2, S. e1000015
- KIM, Hyungjin et al.: Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *In: Mol Cell* 36 (2009) Nr. 3, S. 487-99
- KIM, Ryungsa et al.: Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *In: Cancer Chemother Pharmacol* 50 (2002) Nr. 5, S. 343-52

- KINNER, Andrea et al.: Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *In: Nucleic Acids Res* 36 (2008) Nr. 17, S. 5678-94
- KLEIN, C. ; VASSILEV, L. T.: Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer. *In: Br J Cancer* 91 (2004) Nr. 8, S. 1415-9
- KOPS, Geert J. P. L. ; WEAVER, Beth A. A. ; CLEVELAND, Don W.: On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *In: Nat Rev Cancer* 5 (2005) Nr. 10, S. 773-85
- KRYSTYNIAK, A. et al.: Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *In: Oncogene* 25 (2006) Nr. 3, S. 338-48
- KUERBITZ, S. J. et al.: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) Nr. 16, S. 7491-5
- KUTUK, Ozgur ; LETAI, Anthony: Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *In: Cancer Res* 68 (2008) Nr. 19, S. 7985-94
- LANE, D. P.: Cancer. p53, guardian of the genome. *In: Nature* 358 (1992) Nr. 6381, S. 15-6
- LAU, C. C. ; PARDEE, A. B.: Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982) Nr. 9, S. 2942-6
- LEE, Soyoung ; SCHMITT, Clemens A.: Chemotherapy response and resistance. *In: Curr Opin Genet Dev* 13 (2003) Nr. 1, S. 90-6
- LEVINE, A. J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *In: Cell* 88 (1997) Nr. 3, S. 323-31
- LINDQVIST, Arne ; RODRIGUEZ-BRAVO, Veronica ; MEDEMA, Rene H.: The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *In: J Cell Biol* 185 (2009) Nr. 2, S. 193-202
- LING, Y. H. ; TORNOS, C. ; PEREZ-SOLER, R.: Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. *In: J Biol Chem* 273 (1998) Nr. 30, S. 18984-91
- LIU, Xuesong et al.: Akt inhibitor a-443654 interferes with mitotic progression by regulating aurora a kinase expression. *In: Neoplasia* 10 (2008) Nr. 8, S. 828-37
- LU, Chengrong et al.: Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *In: Mol Cell* 23 (2006) Nr. 1, S. 121-32
- LU, Chengrong et al.: Serum starvation induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via p38 MAPK pathway. *In: FEBS Lett* 582 (2008) Nr. 18, S. 2703-8
- LUO, Y. et al.: Blocking Chk1 expression induces apoptosis and abrogates the G2 checkpoint mechanism. *In: Neoplasia* 3 (2001) Nr. 5, S. 411-9
- MACUREK, Libor ; LINDQVIST, Arne ; MEDEMA, Rene H.: Aurora-A and hBora join the game of Polo. *In: Cancer Res* 69 (2009) Nr. 11, S. 4555-8
- MACUREK, Libor et al.: Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *In: Nature* 455 (2008) Nr. 7209, S. 119-23
- MASSAGUE, Joan: G1 cell-cycle control and cancer. *In: Nature* 432 (2004) Nr. 7015, S. 298-306
- MATSUOKA, Shuhei et al.: ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *In: Science* 316 (2007) Nr. 5828, S. 1160-6
- MESRI, M. et al.: Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *In: J Clin Invest* 108 (2001) Nr. 7, S. 981-90

- MIKHAILOV, Alexei ; COLE, Richard W. ; RIEDER, Conly L.: DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *In: Curr Biol* 12 (2002) Nr. 21, S. 1797-806
- MORGAN, Meredith A. et al.: Role of checkpoint kinase 1 in preventing premature mitosis in response to gemcitabine. *In: Cancer Res* 65 (2005) Nr. 15, S. 6835-42
- NASMYTH, K. ; PETERS, J. M. ; UHLMANN, F.: Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *In: Science* 288 (2000) Nr. 5470, S. 1379-85
- NICHOLS, K. E. et al.: Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *In: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (2001) Nr. 2, S. 83-7
- O'CONNOR, D. S. et al.: Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) Nr. 24, S. 13103-7
- O'CONNOR, Daniel S. et al.: A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *In: Cancer Cell* 2 (2002) Nr. 1, S. 43-54
- PATHAN, N. et al.: Microtubule-targeting drugs induce bcl-2 phosphorylation and association with Pin1. *In: Neoplasia* 3 (2001) Nr. 6, S. 550-9
- POWELL, S. N. et al.: Differential sensitivity of p53(-) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay. *In: Cancer Res* 55 (1995) Nr. 8, S. 1643-8
- RIEDER, C. L. et al.: The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *In: J Cell Biol* 130 (1995) Nr. 4, S. 941-8
- ROBERTS, Elisabeth C. et al.: Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *In: Mol Cell Biol* 22 (2002) Nr. 20, S. 7226-41
- ROGAKOU, E. P. et al.: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *In: J Biol Chem* 273 (1998) Nr. 10, S. 5858-68
- ROGAKOU, E. P. et al.: Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *In: J Biol Chem* 275 (2000) Nr. 13, S. 9390-5
- RONINSON, I. B. ; BROUDE, E. V. ; CHANG, B. D.: If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *In: Drug Resist Updat* 4 (2001) Nr. 5, S. 303-13
- ROYOU, Anne ; MACIAS, Hector ; SULLIVAN, William: The Drosophila Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *In: Curr Biol* 15 (2005) Nr. 4, S. 334-9
- RUCHAUD, Sandrine ; CARMENA, Mar ; EARNSHAW, William C.: Chromosomal passengers: conducting cell division. *In: Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007) Nr. 10, S. 798-812
- RUSSELL, K. J. et al.: Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *In: Cancer Res* 55 (1995) Nr. 8, S. 1639-42
- SANCHEZ, Irma ; DYNLACHT, Brian David: New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *In: Semin Cell Dev Biol* 16 (2005) Nr. 3, S. 311-21
- SAUSVILLE, Edward A.: Cyclin-dependent kinase modulators studied at the NCI: pre-clinical and clinical studies. *In: Curr Med Chem Anticancer Agents* 3 (2003) Nr. 1, S. 47-56
- SCATENA, C. D. et al.: Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *In: J Biol Chem* 273 (1998) Nr. 46, S. 30777-84
- SCHEFFNER, M. et al.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *In: Cell* 63 (1990) Nr. 6, S. 1129-36

- SCHMIDT, Mathias ; BASTIANS, Holger: Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *In: Drug Resist Updat* 10 (2007) Nr. 4-5, S. 162-81
- SHAPIRO, Geoffrey I.: Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *In: J Clin Oncol* 24 (2006) Nr. 11, S. 1770-83
- SHTIVELMAN, Emma ; SUSSMAN, Joshua ; STOKOE, David: A role for PI 3-kinase and PKB activity in the G2/M phase of the cell cycle. *In: Curr Biol* 12 (2002) Nr. 11, S. 919-24
- SHTIVELMAN, Emma: Promotion of mitosis by activated protein kinase B after DNA damage involves polo-like kinase 1 and checkpoint protein CHFR. *In: Mol Cancer Res* 1 (2003) Nr. 13, S. 959-69
- SMITH, Eloise et al.: An ATM- and ATR-dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63. *In: Nat Cell Biol* 11 (2009) Nr. 3, S. 278-85
- SMITS, V. A. et al.: Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *In: Nat Cell Biol* 2 (2000) Nr. 9, S. 672-6
- SOLIER, Stephanie ; POMMIER, Yves: The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *In: Cell Cycle* 8 (2009) Nr. 12, S. 1853-9
- SRIVASTAVA, R. K. et al.: Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) Nr. 7, S. 3775-80
- SRIVASTAVA, R. K. et al.: Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *In: Mol Cell Biol* 18 (1998) Nr. 6, S. 3509-17
- STOLZ, Ailine et al.: Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *In: Cancer Res* 69 (2009) Nr. 9, S. 3874-83
- STRACKER, Travis H. ; USUI, Takehiko ; PETRINI, John H. J.: Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *In: DNA Repair (Amst)* 8 (2009) Nr. 9, S. 1047-54
- STRATE, Lisa L. ; SYNGAL, Sapna: Hereditary colorectal cancer syndromes. *In: Cancer Causes Control* 16 (2005) Nr. 3, S. 201-13
- SYLJUASEN, Randi G. et al.: Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *In: Mol Cell Biol* 25 (2005) Nr. 9, S. 3553-62
- TAMURA, Y. et al.: Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-x(L) during pironetin-induced apoptosis. *In: Oncogene* 28 (2009) Nr. 1, S. 107-16
- TEWEY, K. M. et al.: Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *In: Science* 226 (1984) Nr. 4673, S. 466-8
- THORNBERRY, N. A. ; LAZEBNIK, Y.: Caspases: enemies within. *In: Science* 281 (1998) Nr. 5381, S. 1312-6
- TSE, Archie N. ; CARVAJAL, Richard ; SCHWARTZ, Gary K.: Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *In: Clin Cancer Res* 13 (2007a) Nr. 7, S. 1955-60
- TSE, Archie N. et al.: CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. *In: Clin Cancer Res* 13 (2007b) Nr. 2 Pt 1, S. 591-602
- UPENDER, Madhvi B. et al.: Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *In: Cancer Res* 64 (2004) Nr. 19, S. 6941-9

- VADER, Gerben ; MAIA, Andre F. ; LENS, Susanne Ma: The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *In: Cell Div* 3 (2008) S. 10
- VAN VUGT, Marcel A. T. M. ; BRAS, Alexandra ; MEDEMA, Rene H.: Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *In: Mol Cell* 15 (2004) Nr. 5, S. 799-811
- VARMARK, Hanne et al.: DNA damage-induced cell death is enhanced by progression through mitosis. *In: Cell Cycle* 8 (2009) Nr. 18, S. 2951-63
- VLAHOS, C. J. et al.: A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *In: J Biol Chem* 269 (1994) Nr. 7, S. 5241-8
- VOGEL, Celia ; HAGER, Christian ; BASTIANS, Holger: *Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation*. 2007.
- VOGEL, Celia et al.: The mitotic spindle checkpoint is a critical determinant for topoisomerase-based chemotherapy. *In: J Biol Chem* 280 (2005) Nr. 6, S. 4025-8
- WEAVER, Beth A. A. ; CLEVELAND, Don W.: Does aneuploidy cause cancer? *In: Curr Opin Cell Biol* 18 (2006) Nr. 6, S. 658-67
- WEINSTEIN, I. Bernard ; JOE, Andrew: Oncogene addiction. *In: Cancer Res* 68 (2008) Nr. 9, S. 3077-80; discussion 3080
- YAMAGUCHI, Hirohito et al.: Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *In: J Biol Chem* 279 (2004) Nr. 38, S. 39431-7
- YAMAMOTO, K. ; ICHIJO, H. ; KORSMEYER, S. J.: BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *In: Mol Cell Biol* 19 (1999) Nr. 12, S. 8469-78
- YOULE, Richard J. ; STRASSER, Andreas: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *In: Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) Nr. 1, S. 47-59
- YU, Xiaochun et al.: Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *In: Nat Genet* 37 (2005) Nr. 4, S. 401-6
- ZABLUDOFF, Sonya D. et al.: AZD7762, a novel checkpoint kinase inhibitor, drives checkpoint abrogation and potentiates DNA-targeted therapies. *In: Mol Cancer Ther* 7 (2008) Nr. 9, S. 2955-66
- ZACHOS, George ; GILLESPIE, David A. F.: Exercising restraints: role of Chk1 in regulating the onset and progression of unperturbed mitosis in vertebrate cells. *In: Cell Cycle* 6 (2007) Nr. 7, S. 810-3

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADR	Adriamycin
ALLN	“calpain inhibitor I (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO)”
ATM	“Ataxia telangiectasia mutated”
Bax	“Bcl-2 associated X-protein”
Bcl-2	“B-cell lymphoma 2”
BSA	“bovine serum albumin”
Caspase	“cysteine aspartate protease”
CDK	“cyclin dependend kinase”
CHK1	“checkpoint kinase 1”
CIN	“chromosome instability”
CKI	“CDK inhibitory protein”
DMEM	“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”
DMSO	“dimethyl sulfoxide”
DNA	“desoxyribonucleic acid”
EDTA	“ethylenediaminetetraacetic acid”
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
G1, G2	“gap phase” des Zellzyklus
h	“hour(s)”
H2AX	“H2A histone family, member X”
γ -H2AX	phosphoryliertes H2AX
IP	“immunoprecipitation”
MIN	“microsatellite instability”
mM	millimolar
MPM2	„mitotic protein monoclonal 2“
2N, 4N	Anzahl der Kopien der genetischen Information eukaryotischer Zellen (2N = je ein Chromatid von Mutter und Vater, während G1-Phase) (4N = Zustand nach Verdopplung jedes Chromatides durch die Replikation, während G2-Phase und Mitose)
NOC	Nocodazol
PBS	„phosphate buffered saline“
PI	„propidium iodide“
rpm	„rotations per minute“
SAC	„spindle assembly checkpoint“
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
sub-G1	Ereignisse in der FACS-Analyse, deren DNA-Gehalt deutlicher unter 2N liegt (Apoptosemarker)
Survivin-T34	Phosphorylierungsstelle an Thr34 von Survivin
RNA	„ribonucleic acid“
shRNA	„small hairpin RNA“
RV	Roscovitine
UV	„ultraviolet“
wt	Wildtyp
ZM	ZM447439

7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Holger Bastians für die Überlassung des interessanten Themas und die Einführung in die spannenden Zusammenhänge des Zellzyklus. Seine ständige Ansprechbarkeit und die Begeisterung für das Thema habe ich sehr geschätzt.

Dr. Celia Vogel danke ich für die ausführliche Einführung in einen Großteil der verwendeten Methoden, die ständige Beratung bei methodischen Schwierigkeiten und die kollegiale Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Rolf Müller danke ich als Institutsdirektor des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung für das spannende wissenschaftliche Arbeitsumfeld mit zahlreichen Arbeitsgruppen im Bereich der Tumorforschung und regelmäßigen interessanten Vorträgen.

Anne Kienitz, Dr. Ailine Stolz und Dr. Verena Schneider danke ich für die vielen Tipps und Tricks zur Bewältigung und Aufheiterung des manchmal etwas eintönigen Laboralltags.

Dr. Thomas Groß, Dr. Alexandra Hackmann, Lydia Schild und Prof. Dr. Heike Krebber danke ich für das gute Arbeitsklima und den wissenschaftlichen Austausch bei den zahlreichen Vorträgen, die mir Einblicke in Hefenkultivierung und Translationsprozesse gewährten.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Anne und Gerd Hager, auf deren Unterstützung ich mich während der Entstehung dieser Arbeit immer verlassen konnte.

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

Bartsch, Basler, Bastians, Eilers, Gudermann, Hamer, Hasilik, Holland, Kann, Klose, Koolmann, Kuhlmann, Lang, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Mandrek, Moll, Müller, Neubauer, Oertel, Renz, Röper, Rothmund, Schäfer, Steiniger, Wagner in Marburg; Bridoux, Hankard, Herpin in Poitiers; Chilcott, Hubert, Morel in Genf; Mackert in Berlin.