

**HDAC-Inhibitor-induzierte Sensibilisierung
HPV-positiver Zervixkarzinomzellen für die
Todesliganden-vermittelte Apoptose**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Biowissenschaften

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Ingenieurin (FH)

Katalin Darvas

geb. in Miercurea-Ciuc (Rumänien)

März 2008

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2004 bis September 2007 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Rösl.

Gutachter:

Prof. Dr. Rainer Zawatzky

(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

PD Dr. Dieter Kübler

(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

Tag der mündliche Prüfung:

28. Mai 2008

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, 27. März 2008

(Katalin Darvas)

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	5
<i>Zusammenfassung</i>	8
<i>Summary</i>	9
1. Einleitung	10
1.1. Humane Papillomviren (HPV)	10
1.1.1 HPV und Gebärmutterhalskrebs.....	10
1.1.2 Genomische Organisation und Replikation von HPV.....	10
1.1.3 Die Funktion der viralen Onkogene E6 und E7	12
1.1.4 Mehrstufenmodell der HPV-induzierten Karzinogenese	12
1.2 Apoptose - Der programmierte Zelltod	14
1.2.1 Todesrezeptoren und HPV	16
1.2.2 Inhibition der Apoptose durch c-FLIP	16
1.3 Der Transkriptionsfaktor NF-κB	18
1.4 Histondeacetylase Inhibitoren	19
1.4.1 Die Chromatinstruktur.....	19
1.4.3 HDACs und Gebärmutterhalskrebs.....	20
1.4.4 HDAC Inhibitoren.....	21
2. Zielsetzung	23
3. Materialien und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.1.1 Chemikalien	24
3.1.2 Laborausstattung	26
3.1.3 Arbeitsmaterialien	26
3.1.4 Lösungen	27
3.1.5 Antikörper für Western Blot	30
3.1.6 Enzyme.....	31
3.1.7 Größen-Marker.....	31
3.1.8 Kits	32
3.1.9 Plasmid.....	32
3.1.10 Zellen.....	32
3.1.11 Reagenzien und Medien für die Zellkultur	34
3.1.12 Nukleotide und Oligonukleotide	35
3.2. Methoden	36

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	36
3.2.2 Transfektion von Säugerzellen.....	37
3.2.3 Präparation und Analyse von Proteinen.....	37
3.2.4 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren.....	41
3.2.5 Northern Blot Analyse.....	42
3.2.6 Semiquantitative RT-PCR Analyse.....	43
3.2.7 RNA-Interferenz (RNAi).....	44
3.2.8 Analyse von Protein/DNA-Komplexen.....	45
3.2.9 Fluss-Cytometrie-Analyse (FCM).....	46
3.2.10 Gewinnung konditionierter Medien/ Makrophagen-Überstände.....	47
4. Ergebnisse.....	48
4.1 HDAC-Inhibition sensibilisiert HeLa Zellen für die Todesliganden-vermittelte Apoptose.....	48
4.1.1 HDAC-Inhibition erhöht signifikant die CD95- und sensibilisiert für die TNF α - /TRAIL-induzierte Apoptose.....	48
4.2 Die HDAC-Inhibitor-induzierte c-FLIP-Suppression ist für die Apoptose-Sensibilisierung verantwortlich.....	51
4.2.1 HDAC-Inhibitoren führen zu einer konzentrations- und zeitabhängiger c-FLIP Suppression.....	51
4.2.2 Stabile Expression von c-FLIP verhindert die Apoptose-Sensibilisierung.....	53
4.3 NaB-induzierte Hemmung der NF-κB DNA-Bindung ist nicht die Ursache der c-FLIP-Suppression.....	58
4.3.1 HDAC Inhibition hemmt die konstitutive und induzierbare NF- κ B DNA-Bindungsaktivität.....	58
4.3.2 HDAC-Inhibition führt zur Suppression von NF κ B1 (p50) während p65 unbeeinflusst bleibt.....	59
4.3.3 HDAC-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Translokation der NF- κ B-Proteine in den Nukleus.....	60
4.3.4 HDAC-Inhibition verursacht eine Reduktion von Bcl-3 auf Proteinebene.....	61
4.3.5 Bcl-3 hat keinen Einfluss auf die c-FLIP-Suppression.....	62
4.3.6 siRNA gegen NF κ B1 (p50) hat keinen Einfluss auf c-FLIP-Expression.....	64
4.3.7 NaB induziert eine c-FLIP-Suppression auch in NF κ B1-defizienten HeLa.....	65
4.3.8 HDAC-Inhibitor-induzierte c-FLIP-Suppression ist unabhängig von NF- κ B p50.....	66
4.4 HDAC-Inhibition induziert keinen c-FLIP-Repressor.....	68
4.5 Neben transkriptioneller Suppression ist auch eine proteasomale Degradation an der NaB-vermittelten c-FLIP-Reduktion beteiligt.....	69

4.6 HDAC-Inhibition führt in NaB-resistenten (NaB^R) HeLa Klonen zu keiner Apoptose-Sensibilisierung	71
4.6.1 Vergleich von NaB ^R Klonen mit Wildtyp HeLa bei steigender HDAC-Inhibitor-Konzentration	71
4.6.2 NaB-induzierte intrinsische Apoptose ist in den NaB ^R Klonen stark inhibiert.....	72
4.6.3 NaB-induzierte Sensibilisierung gegenüber extrinsischer Apoptose ist in NaB ^R Klonen fast vollständig inhibiert	73
4.7 Therapeutische Relevanz der NaB-induzierten Apoptose-Sensibilisierung	75
4.7.1 NaB führt auch in HPV-negativen Zellen zu c-FLIP-Suppression	75
4.7.2 NaB induziert in HPV-negativen Zellen keine Apoptose	76
4.7.3 siRNA gegen HPV18 verhindert die HDAC-Inhibitor-induzierte Apoptose-Sensibilisierung	76
4.7.4 Konditioniertes Medium von primären Makrophagen induziert Apoptose in HeLa nach NaB-Behandlung	79
5. Diskussion.....	81
5.1. Die zwei Ebenen der c-FLIP-Regulation.....	81
5.2 Die Regulation der c-FLIP-Transkription.....	83
5.3 HDAC-Inhibitor-induzierte Apoptose-Sensibilisierung	85
6. Literaturverzeichnis.....	89
7. Anhang.....	99
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	99
7.2 Danksagung.....	101
7.3 Veröffentlichung von Teilergebnissen der Dissertation	102

Zusammenfassung

Die wichtigsten Voraussetzungen für die Expansion von Tumoren sind uneingeschränkte Proliferation und die Fähigkeit, Apoptose zu umgehen. In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren, wie z.B. Natriumbutyrat, in der Lage sind, beides anzugreifen - die ungehinderte Proliferation und die Apoptosehemmung - indem sie Wachstumsarretierung und eine ausschließlich intrinsische Apoptose in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen induzieren. In dieser Arbeit wurde der experimentellen Beweis erbracht, dass die Zervixkarzinomzelllinie HeLa, die vollständig resistent gegenüber der TNF α und TRAIL-vermittelten Apoptose war, durch Inhibition der HDAC-Aktivität gegenüber beiden Todesliganden sensibilisiert werden konnte. Zusätzlich wurde auch die CD95L-induzierte Apoptose durch HDAC-Inhibition signifikant erhöht.

Die Suppression der anti-apoptotischen Proteine c-FLIP_L und c-FLIP_S wurde als ursächliches Ereignis für die Apoptose-Sensibilisierung identifiziert. Bisher wurde vermutet, dass NF- κ B an der transkriptionellen Aktivierung von c-FLIP beteiligt ist. Hemmung der HDAC-Aktivität führte zu einer signifikanten Verringerung sowohl der konstitutiven als auch der induzierbaren NF- κ B DNA-Bindungsaktivität, die sich eindeutig dem NF- κ B-Protein p50 zuordnen ließ. Allerdings konnte die HDAC-Inhibitor-induzierte NF- κ B-Hemmung als Ursache für die c-FLIP-Suppression, unter anderem durch die Verwendung von siRNA gegen NF κ B1, ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die HDAC-Inhibition weder ein transkriptioneller c-FLIP-Repressor induziert, noch ein für die Transkription essentieller Faktor degradiert wurde.

Hemmung des proteasomalen Abbaus ergab zum einen, dass die reduzierten c-FLIP-Proteinmengen nicht ausschließlich auf eine transkriptionelle Repression, sondern auch auf eine zusätzliche proteasomale Degradation zurückzuführen waren. Zum anderen wurde dabei deutlich, dass die beiden c-FLIP Isotypen auf Proteinebene unterschiedlich reguliert wurden, wobei sich für c-FLIP_S eine präferenziell proteasomale Degradation herausstellte.

Für den synergistischen Effekt zwischen HDAC-Inhibition und TNF α -Stimulation erwies sich die Anwesenheit von HPV als Voraussetzung, denn in HPV-negativen Zellen und nach Depletion von HPV durch siRNA fand keine Apoptose-Sensibilisierung statt.

Für Zervixkarzinome sind Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) beschrieben worden, die stets mit einer schlechten klinischen Prognose und einer Tumorprogression in Verbindung gebracht werden. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass das von primären aktivierten Makrophagen sezernierte TNF α in konditioniertem Medium ausreicht, um in HeLa Zellen nach HDAC-Inhibition Apoptose zu induzieren. Die Verwendung von HDAC-Inhibitoren könnte somit die TAMs ausnutzen, um Tumorzellen effektiver zu eliminieren.

HDAC-Inhibitoren scheinen nach diesen Resultaten vielversprechene Krebstherapeutika darzustellen. Sie können als direkte Agenzien eingesetzt werden, um Wachstumsarretierung und intrinsische Apoptose zu induzieren. In Kombination mit Todesliganden - rekombinant oder sezerniert von TAMs - weisen sie einen synergistischen Effekt auf und verringern in Tumorzellen den Schwellenwert der Apoptose-Induktion um ein Vielfaches.

Summary

Infinite proliferation and capability to evade apoptosis are important prerequisites for expansion of tumour cells. HDAC inhibitors (HDACi) have been identified as agents that are able to attack both, proliferation and apoptosis resistance by inducing growth arrest and intrinsic apoptosis in HPV-positive cervical carcinoma cells. Here, I present experimental evidence that the cervical carcinoma cell line HeLa, which is known to be completely resistant to TNF α - or TRAIL-induced apoptosis, can be rendered sensitive to both death receptor ligands after HDAC inhibition. Additionally, the amount of CD95-mediated apoptosis is further increased by pre-treatment with HDACi.

Overexpression studies have clearly proved that HDACi-induced suppression of anti-apoptotic c-FLIP proteins represents the causal event for this sensitization. NF- κ B was described to stimulate c-FLIP expression. Yet, HDACi significantly inhibited constitutive and induced NF- κ B DNA binding activity, for which p50 was identified as the causative molecule. However, siRNA directed against NFKB1 and recovery experiments excluded NF- κ B inhibition as reason for transcriptional down-regulation of c-FLIP. Furthermore, I could definitely exclude an HDACi mediated induction of a transcriptional c-FLIP repressor as well as the degradation of a factor which might be essential for c-FLIP expression.

Inhibiting the proteasome clearly demonstrated that reduced c-FLIP protein levels were not only due to transcriptional repression but also due to an additional c-FLIP protein degradation. In addition, these experiments showed that c-FLIP proteins in untreated cells are differentially controlled: half-life of c-FLIP_S is dependent on the proteasome, while c-FLIP_L half-life is not.

It should be noted that the synergistic effect of a combined HDACi/TNF α treatment in eradication of cervical cancer cells is not observed in the absence of HPV, despite c-FLIP was also found to be down-regulated, pointing to the role of HPV to be essential for sensitization.

For many cervical tumors tumour associated macrophages (TAMs) have been described. However, TAMs are always associated with a bad clinical prognosis and cancer progression. Here, I could provide evidence that TNF α of primary activated macrophage-conditioned medium was sufficient to induce apoptosis after HDAC inhibitor pre-treatment at the same range as recombinant TNF α . Therefore, with the help of HDAC inhibitors, presence of TAMs could even be beneficial in eradicating cervical cancer cells.

Taken together, these results support the notion that HDACi are promising cancer therapeutics since they do not only induce growth arrest and intrinsic apoptosis, but in combination with death receptor ligands, exhibit a synergistic effect and lower to a high extent the apoptotic threshold within tumour cells.

1. Einleitung

1.1. Humane Papillomviren (HPV)

1.1.1 HPV und Gebärmutterhalskrebs

Krebs des Gebärmutterhalses (Zervixkarzinom) ist nach Brustkrebs (Mammakarzinom) die weltweit zweithäufigste Tumorerkrankung bei Frauen (Pisani et al., 2002). Auch wenn Inzidenz und Mortalität in den letzten Jahren in Deutschland zurückgegangen sind (DKFZ Krebsatlas für 2002), so stellt das Zervixkarzinom in vielen Entwicklungsländern immer noch die häufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen der Frau dar (Cronje, 2004).

Wie allgemein für Krebs postuliert, ist die Karzinogenese von Gebärmutterhalskrebs ein mehrstufiger Prozess, der sich über einen Zeitraum von vielen Jahren bis Jahrzehnten erstreckt (zur Hausen H., 1996; Hahn and Weinberg, 2002). Dem Zervixkarzinom gehen Präkanzerosen (Krebsvorstufen) voraus, welche klinisch als zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) klassifiziert werden. Man unterscheidet drei Stufen: Die geringe Dysplasie (CIN I), die mittelgradige Dysplasie (CIN II) und die schwere Dysplasie (CIN III). Letztere, auch als Karzinom *in situ* bezeichnet, bedeutet die Manifestation von Krebs in einem sehr frühen Stadium, welches wiederum Jahre bis Jahrzehnte benötigt, um sich zu einem invasiven Tumor zu entwickeln (zur Hausen, 2002). Dabei kommt es allerdings häufig zu einer Regression der prämaligen Vorstufen, so dass nur etwa 10% der Fälle sich langfristig zu einem invasiven Tumor entwickeln (Katase et al., 1995).

Die mit der Ätiologie von Gebärmutterhalskrebs verbundenen Risikofaktoren sind weitgehend bekannt: ungeschützter Geschlechtsverkehr, häufiger Partnerwechsel sowie mangelnde Genitalhygiene (Schiffman and Brinton, 1995; Burger et al., 1996). Epidemiologische Studien belegen, dass über 95% der Zervixkarzinome mit der Infektion von humanen Papillomviren (HPV) assoziiert sind (Gissmann et al., 1983; Bosch et al., 1995). Darüber hinaus sind an der mehrstufigen Karzinogenese weitere Faktoren beteiligt, so dass die Primärinfektion mit HPV nicht als alleinige Ursache anzusehen ist, aber eindeutig den Hauptrisikofaktor bei der Ätiologie des Zervixkarzinoms darstellt (zur Hausen, 2002).

1.1.2 Genomische Organisation und Replikation von HPV

Papillomviren gehören, zur Familie der Papovaviridae (papilloma-, polyoma-, vacuolating virus) und bestehen aus kleinen, ikosaedrischen Kapsiden, die ein zirkuläres, kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 8 kb enthalten (Favre et al., 1975; Pfister and zur Hausen H., 1978).

Bei allen Papillomviren ist eine ähnliche Genomorganisation vorzufinden. Beispielhaft ist in Abb.1.1 die genomische Organisation von HPV18 dargestellt.

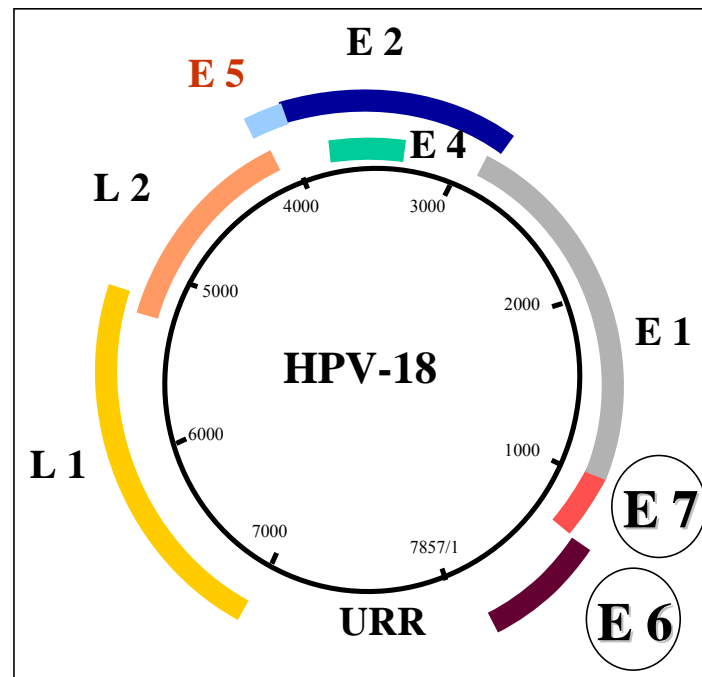


Abb.1.1: Schematische Darstellung des HPV18-Genoms. E1-E7: offene Leseraster der „frühen“ Gene, L1, L2: offene Leseraster der „späten“ Gene, URR („upstream regulatory region“). Die Nukleotide werden von 1-7857 durchnummeriert.

Der Genomaufbau lässt sich in zwei funktionelle Abschnitte gliedern: Ein Bereich, der für die früh im Replikationszyklus exprimierte Proteine E1 bis E7 codiert, sowie ein zweiter, welcher die Gene für die spät synthetisierten Strukturproteine L1 und L2 enthält (Del Vecchio et al., 1992). Die Loci der früh und spät exprimierten Gene werden durch eine 800 - 1000 bp lange Region getrennt, die als URR („upstream regulatory region“) bezeichnet wird. Sie beinhaltet die wichtigsten *cis*-regulatorischen Elemente für die Transkription sowie den viralen Replikationsursprung (Swift et al., 1987). Sowohl im Enhancer- als auch im Promotor-Bereich der URR finden sich, neben Erkennungs-Sequenzen für viruseigene Faktoren wie dem E2-Protein, das die Transkription von E6 und E7 reguliert (Romanczuk et al., 1990; Chiang et al., 1992), auch Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren wie AP-1, Oct-1, NF-1, KRF-1, GRE, YY-1 und SP-1 (Butz and Hoppe-Seyler, 1993; Hoppe-Seyler and Butz, 1994).

Der produktive Lebenszyklus der Papillomviren ist vom Differenzierungsgrad der Wirtszellen abhängig und verläuft in zwei Phasen. Die Viren infizieren, meist über Läsionen der äußeren Hautschichten, undifferenzierte Basalzellen der Epidermis, in denen die frühen viralen Gene transkribiert werden (Iftner et al., 1992). Mit Fortschreiten der vertikalen Differenzierung werden auch die Strukturproteine exprimiert und es erfolgt schließlich die Freisetzung der Viruspartikel. Da die Partikelproduktion und Lyse dabei auf stärker differenzierte Hautschichten limitiert ist, können die Viren über Jahre episomal im Nukleus

infizierter Basalzellen persistieren. Dies trägt zur langen Latenzzeit des Zervixkarzinoms von 20 bis 30 Jahren bei (Stubenrauch and Laimins, 1999).

Während die virale DNA in prämaligen Dysplasien in episomaler Form vorliegt (Durst et al., 1985), unterstützt ihre Integration in das Genom der Wirtszelle den Immortalisierungsprozess (von Knebel et al., 1991). Grund dafür ist die Linearisierung der Virus-DNA vor der Integration, die zur Zerstörung des E2-Leserasters und damit verbunden zum Verlust der *trans*-repressorischen Funktion des Proteins auf die E6/E7-Transkription führt. Die Folge ist eine unkontrollierte Expression der Onkogene E6 und E7 (Cripe et al., 1987).

1.1.3 Die Funktion der viralen Onkogene E6 und E7

Die viralen Onkogene E6 und E7 sind für das transformierende Potential der „*high risk*“ HPV-Typen verantwortlich. Ihre physikalische und funktionelle Interaktion mit zellulären Tumorsuppressor-Proteinen spielt bei der HPV-initiierten Immortalisierung sowie bei der Aufrechterhaltung des tumorigenen Phänotyps von Zervixkarzinomzellen eine entscheidende Rolle (von Knebel et al., 1992).

Ein Ziel von E6 ist das Protein p53, das bei DNA-Schädigungen eine Zellzyklusarrestierung herbeiführt, um die Reparatur der DNA zu ermöglichen (Maltzman and Czyzyk, 1984; Fritsche et al., 1993). Das E6-Onkoprotein der Hochrisikotypen bindet nun sowohl p53 als auch dessen Ubiquitin-Protein-Ligase (E6-AP), wodurch die Degradation des Tumorsuppressor-Proteins durch das Proteasom eingeleitet wird (Fritsche et al., 1993; Scheffner et al., 1993). Die Folgen sind neben einem anti-apoptischen Effekt die Anhäufung von Mutationen, chromosomale Instabilität und Aneuploidie (Duensing and Munger, 2003). Zudem trägt das E6-Protein durch Aktivierung der Telomerase zur Immortalisierung der Wirtszelle bei (Klingelhutz et al., 1996).

Das E7-Protein der „*high risk*“ HPV-Typen interagiert mit den Retinoblastomproteinen pRB und p107 (Scheffner et al., 1990), die an den Transkriptionsfaktor E2F-1 binden (Goodrich and Lee, 1993; La Thangue, 1994). Die Interaktion von E7 mit pRb führt zur Freisetzung von E2F-1, wodurch die Transkription von Genen, die die Zellproliferation positiv regulieren, induziert werden kann (Bagchi et al., 1991; Bandara et al., 1991).

Die Bindung von E6 an p53 und von E7 an pRB der „*low risk*“ HPV-Typen hingegen erfolgt mit einer 10-fach geringeren Affinität (Heck et al., 1992). Neben den genannten zellulären Proteinen p53 und pRb können HPV E6 und E7 mit vielen weiteren Proteinen, darunter zahlreiche chromatinregulatorische Moleküle (Finzer et al., 2001), interagieren.

1.1.4 Mehrstufenmodell der HPV-induzierten Karzinogenese

Epidemiologische und molekularbiologische Studien zeigen, dass die Infektion mit „*high risk*“ HPV-Typen nicht allein für die Entstehung eines malignen Karzinoms ausreicht. So führt die ektopische Expression der HPV 16 oder 18 E6/E7-Gene unter einem

konstitutiven Promotor lediglich zur Immortalisierung primärer Keratinozyten (Schlegel et al., 1988; Munger et al., 1989), während die tumorigene Transformation erst durch das Einbringen eines weiteren Onkogens ausgelöst wird (Pei et al., 1993). Dennoch ist die Expression der viralen Onkogene für die Aufrechterhaltung des tumorigenen Phänotyps von Zervixkarzinomzellen *in vivo* und *in vitro* essentiell (Watanabe et al., 1993; Venturini et al., 1999). Demnach müssen im Verlauf der E6/E7-induzierten Karzinogenese weitere Veränderungen, wie die Aktivierung zellulärer Onkogene oder die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen auftreten, um einen tumorigenen Phänotyp hervorzurufen (Durst et al., 1995).

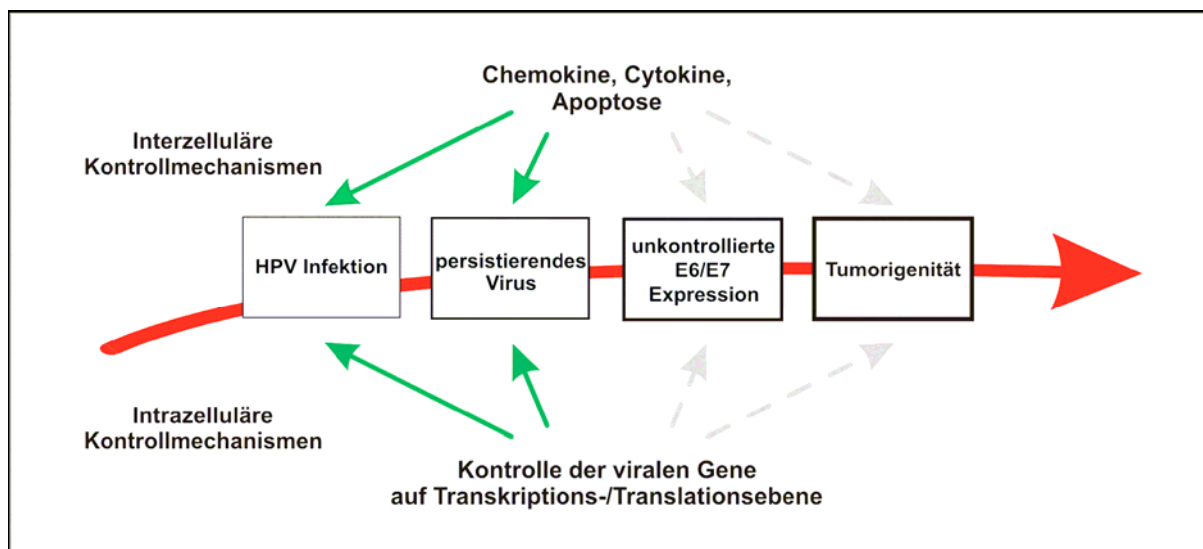


Abb.1.2: Mehrstufenmodell der HPV-induzierten Karzinogenese. Die Expression der viralen Onkogene E6/E7 unterliegt mehreren sowohl interzellulären als auch intrazellulären Kontrollmechanismen. Erst deren Verlust im Verlauf der mehrstufigen Karzinogenese führt letztendlich zur tumorigenen Transformation der Zelle (zur Hausen H., 1991).

Auf diesen Überlegungen basierend, postuliert das Mehrstufenmodell der HPV-induzierten Karzinogenese die Existenz inter- und intrazellulärer Mechanismen, die trotz viriler Persistenz in der Lage sind, die Expression der E6/E7-Onkogene negativ zu regulieren (Abb.1.2). Erst der Verlust dieser Kontrolle führt zur Immortalisierung und schließlich zur tumorigenen Transformation der infizierten Zelle (zur Hausen H., 1991; zur Hausen H. and Rosl, 1994).

Proinflammatorische Cytokine sowie pro-apoptotische Faktoren sind Teil eines interzellulären Signalweges, der in der Lage ist, die HPV-Genexpression auf Ebene der Transkription zu beeinflussen. So führt die Behandlung von HPV-immortalisierten Zellen mit Cytokinen wie TGF- β (*transforming growth factor*- β) oder Interleukin 1 (IL-1) zu einer fast vollständigen Suppression der viralen Transkription (Braun et al., 1990; Woodworth et al., 1990; Kyo et al., 1994; Malejczyk et al., 1996).

1.2 Apoptose - Der programmierte Zelltod

Zellen besitzen einen Mechanismus zur Selbstzerstörung, die so genannte Apoptose. Im Organismus spielt Apoptose für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes von Zellteilung und Zelltod, neben der Proliferation, die entscheidende Rolle. Zu hohe oder zu niedrige Apoptoseraten sind an der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen oder Krebs beteiligt (Igney and Krammer, 2002a; Igney and Krammer, 2002b).

Apoptose ist durch die Aktivierung regulierter katabolischer Enzyme, wie Proteasen und Nukleasen, und durch eine Vielzahl morphologischer Veränderungen charakterisiert. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, welches im Bereich der nukleären Peripherie aggregiert. In den kondensierten Chromosomen wird die DNA durch spezielle Endonukleasen abgebaut. Diese spalten die DNA zwischen den Histonkomplexen, was zur Entstehung von DNA-Fragmenten der charakteristischen Größe von 200 bp führt (Wyllie, 1980). Des Weiteren kommt es zu einem Verlust der Membranstabilität. Dies führt zu Ausstülpungen der Plasmamembran (Zeiose) und mündet schließlich im Abschnüren membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden (Hengartner and Bryant, 2000).

Apoptose kann auf zwei unterschiedlichen Wegen eingeleitet werden: vermittelt durch die Mitochondrien (intrinsischer Weg) oder durch so genannte Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche (extrinsischer Weg) (Krammer, 1999; Schmitz et al., 2000).

Die Apoptose Induktion durch den intrinsischen Weg führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, Freisetzung von Cytochrom *c* ins Cytoplasma und resultiert schließlich in der Aktivierung von Caspase 9 im so genannten Apoptosom (Igney and Krammer, 2002a; Igney and Krammer, 2002b).

Die im extrinsischen Weg involvierten Todesrezeptoren sind Transmembranproteine und Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie. Solche Todesrezeptoren sind zum Beispiel TNF-R1, CD95, TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 („*TNF-related apoptosis-inducing ligand*“) (Schmitz et al., 2000; Krammer, 1999). Durch Bindung von natürlichen Liganden der TNF Familie wird die Apoptose induziert. Es kommt zur Bildung des so genannten „*death inducing signalling complex*“ (DISC), die mit der Trimerisierung des Todesrezeptors beginnt. Im intrazellulären Teil bindet nun das Adaptermolekül FADD („*Fas associated death domain*“) mit seiner Todesdomäne („*death domain*“, DD) an die Todesdomäne des trimerisierten Rezeptors (Igney and Krammer, 2002b). Das an den Rezeptor assoziierte FADD kann nun über seine Todeseffektordomäne („*death effector domain*“, DED), die strukturelle Ähnlichkeit zur Todesdomäne besitzt, wiederum mit der Todeseffektordomäne von Procaspase 8 interagieren, und wirkt so als „Brückenmolekül“ zwischen dem Rezeptor und der Procaspase. Von einem Procaspase 8 Molekül werden nun zwei Fragmente mit

Caspase-Domänen abgespalten, die aneinander binden. Zwei solcher Heterodimere bilden schließlich das proteolytisch aktive Heterotetramer der Caspase 8.

Die Caspasen, die an den DISC rekrutiert, geschnitten und dadurch aktiviert werden, haben die Bezeichnung Initiator-Caspasen erhalten (Igney and Krammer, 2002a; Igney and Krammer, 2002b).

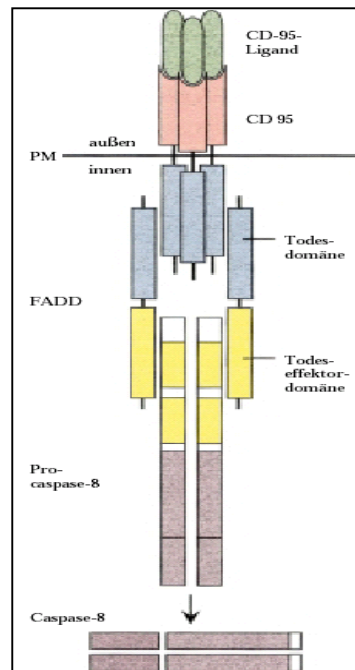


Abb.1.5: Todesrezeptor am Beispiel des CD95. Bindung des Liganden am Rezeptor: Bildung des DISC beginnt mit Trimerisierung des Todesrezeptors. Cytoplasma: FADD bindet an den Trimer. Rezeptor und FADD besitzen eine Todesdomäne. An FADD kann nun Procaspase 8 binden. FADD und Procaspase 8 interagieren über ihre Todes-effektordomäne. Procaspase 8-Molekül: Abspaltung zweier Fragmente mit den Caspase-Domänen, die aneinander binden. Zwei Heterodimere: proteolytisch aktive Heterotetramer der Caspase 8 (aus Hug, 2000).

Trotz der Unterschiede in der Initialisierung steht am Ende beider Apoptosewege die Aktivierung der Caspase 3. Diese so genannte Exekutions-Caspase leitet unwiderruflich das Erscheinen der bereits beschriebenen charakteristischen apoptotischen Merkmale, wie die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen, ein.

1.2.1 Todesrezeptoren und HPV

Humanpathogene DNA-Viren haben effektive Strategien entwickelt, um die apoptotische Antwort des infizierten Organismus zu modulieren (Finzer et al., 2002; Hardwick, 1998). Im Fall von HPV konnte experimentell gezeigt werden, dass HPV 16 E5-Protein die Anzahl der CD95-Rezeptoren an der Zelloberfläche reduzieren kann (Kabsch and Alonso, 2002). Da allerdings in Zervixkarzinomzellen nach der HPV-Integration E5 meist deletiert ist (Rosl et al., 1997), spielt die reduzierte Anzahl der CD95-Todesrezeptoren nur im natürlichen Lebenszyklus des Virus eine Rolle und nicht im integrierten Zustand (Finzer et al., 2002).

Die Inaktivierung von p53 durch E6 scheint ein regulatorisches Schlüsselereignis in der CD95-induzierten Apoptose zu sein (Finzer et al., 2002). Die Bindung des CD95-Liganden führt lediglich in E7-immortalisierten Zellen zu Apoptose, während E6- und E7/E6-exprimierende Keratinozyten resistent sind (Aguilar-Lemarro et al., 2002).

Es existieren weitere Wege, durch die E6, unabhängig von p53, anti-apoptotische Effekte ausüben kann. E6 interferiert mit der TNF α vermittelten Apoptose in Maus- und Humanzellen (Finzer et al., 2002; Filippova et al., 2002). Die Anzahl der TNF-Rezeptoren (TNFR1) wird nicht beeinflusst. Der Schutz erfolgt durch die blockierte Interaktion der Todesdomänen vom TNFR1 und FADD durch HPV 16 E6 (Finzer et al., 2002; Thompson et al., 2001), wodurch die Aktivierung von Procaspase 8 verhindert wird. Dadurch kann auch Procaspase 3 nicht aktiviert und folglich die Apoptose nicht ausgeführt werden (Finzer et al., 2002; Filippova et al., 2002)

1.2.2 Inhibition der Apoptose durch c-FLIP

Resistenz gegenüber Apoptose ist ein wichtiger Schlüsselfaktor für die Krebsentwicklung. Da die Wirkung von Chemo- und Strahlentherapie hauptsächlich auf Apoptose-Induktion beruht, sind Defekte im Apoptoseweg zudem auch verantwortlich für Therapieresistenz. Daher ist die Überwindung von Apoptose -Resistenz eines der Hauptziele bei der Krebsbehandlung.

Todesrezeptor vermittelte Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden (Scaffidi et al., 1999), zum Beispiel durch die Expression anti-apoptotischer Proteine, die die Apoptose bereits am DISC inhibieren. Datenbankrecherchen führten zur Identifizierung einer Familie von DED-enhaltenden Proteinen, die zur Klasse der γ -Herpes Viren gehören. Diese Proteine wurden „*viral FLICE-inhibitory proteins*“ (v-FLIP) genannt. v-FLIPs enthalten zwei DEDs. Sie binden den DISC und inhibieren dadurch die Aktivierung von Procaspase 8.

Das zelluläre Homolog zu v-FLIP wurde c-FLIP/FLAME-1/I-FLICE/Casper/CASH/MRIT/CLARP/Usurpin (Tschopp et al., 1998) genannt. Mehrere Spleiß-Varianten von c-FLIP mRNA wurden beschrieben, jedoch konnten bis jetzt lediglich drei Formen von c-FLIP - c-FLIPs, c-FLIP_L und das erst kürzlich identifizierte c-FLIP_R - auf Proteinebene gefunden werden (Scaffidi et al., 1999; Golks et al., 2005). Die lange Form c-FLIP_L ist strukturell mit

Procaspase 8 verwandt, enthält aber ein enzymatisch inaktives Zentrum und interferiert mit der Bildung aktiver Caspase 8 Untereinheiten am Rezeptor. Die kurze Form c-FLIP_S ähnelt strukturell v-FLIP, enthält nur zwei DEDs und einen C-Terminus, der sich von Procaspase 8 unterscheidet (Scaffidi et al., 1999). Caspase Aktivierung wird in zwei verschiedenen Spaltungsschritten am DISC durch die c-FLIP Isoformen inhibiert. c-FLIP_S hemmt bereits die erste Spaltung von Procaspase 8, während c-FLIP_L den ersten Spaltungsschritt unterstützt, aber die weitere Prozessierung und somit die Apoptose-Induktion blockt. Dieser Unterschied zwischen beiden c-FLIP Formen in der Ausübung ihrer Funktion kann durch die Deletion der p12 Untereinheit von c-FLIP_L aufgehoben werden. (Hietakangas et al., 2003; Krueger et al., 2001b).

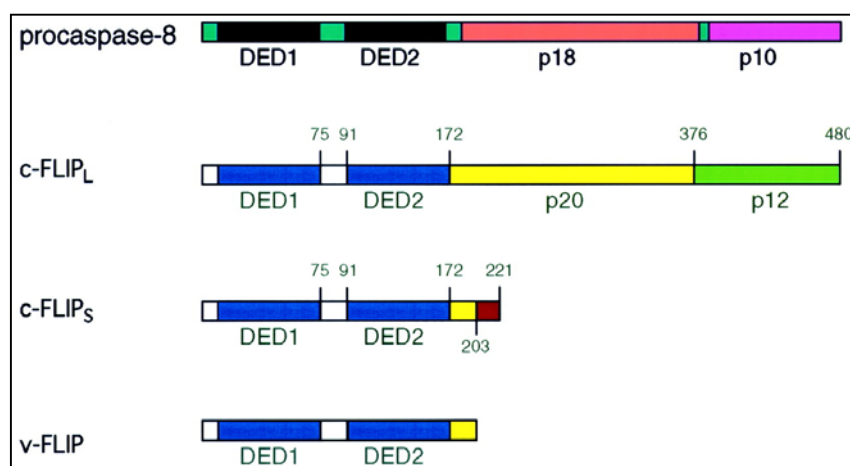


Abb.1.5: Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Caspase 8 und FLIP. DED 1 und 2 sind bei Procaspase 8 und c-FLIP zu finden. Procaspase 8 besitzt zusätzlich zwei Untereinheiten: p18 und p10, c-FLIP_L hat ebenfalls zwei Domänen p20 und p12 (Krueger et al., 2001b).

1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B ist ein allgemeiner Name für dimere Transkriptionsfaktoren der Rel Familie. Diese Transkriptionsfaktor-Familie wurde mit diversen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht, unter anderem Wachstumsregulierung (Karin et al., 2002). Fünf NF- κ B Gene wurden identifiziert - NF κ B1, NF κ B2, RELA, c-REL and RELB - die zu der in der Expression von sieben Proteinen führen: p105, p100, p50, p52, RelA (p65), c-Rel und RelB.

Die Aktivität von NF- κ B wird durch inhibitorische Moleküle, wie zum Beispiel I κ Bs (Karin et al., 2002) reguliert. Nach TNF α Stimulation phosphoryliert der I κ B Kinase (IKK) Komplex I κ B α , was dessen Ubiquitinierung und anschließende Degradation durch das Proteasom zur Folge hat. Dabei werden die an I κ B α gebundenen NF- κ B Moleküle frei, können in den Zellkern gelangen und dort NF- κ B abhängige Gene transaktivieren (Karin and Ben Neriah, 2000).

Viele NF- κ B abhängige Gene sind in die Hemmung von Apoptose involviert, unter anderem IAP-1 and IAP-2 (Igney and Krammer, 2002a). Der wirksamste, NF- κ B abhängige Inhibitor von Apoptose ist allerdings das bereits beschriebene c-FLIP (Micheau et al., 2001).

1.4 Histondeacetylase Inhibitoren

1.4.1 Die Chromatinstruktur

Die genetische Information von Eukaryoten ist im Chromatin organisiert, in dem die DNA um Histonkomplexe gewickelt ist. Die zugrunde liegende Einheit dieser hochorganisierten Struktur ist das so genannte Nukleosom. Ein Nukleosom besteht aus einem Komplex aus 146 bp DNA und einem Histonoktamer. Um diesen Nukleosomkern (*Core-Partikel*), der aus je zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht, windet sich die DNA-Helix (Abb.1.3). Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen sind schwach und nicht sequenzspezifisch (Marks et al., 2004).

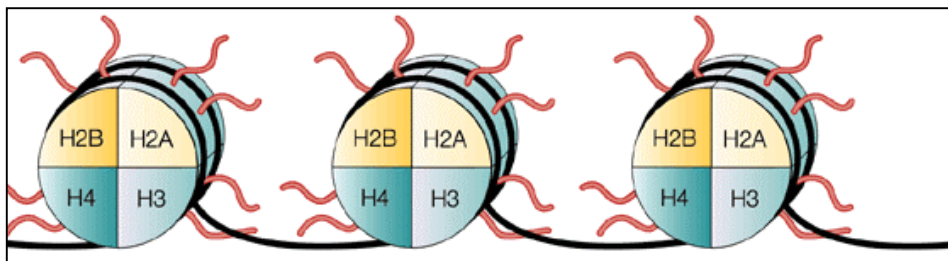


Abb.1.3: Schematische Histonstruktur in Nukleosomen. Der Histonkern besteht aus je zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Die DNA (schwarz dargestellt) windet sich um das Histonoktamer. Rot dargestellt sind die aminoterminalen Schwänze, (Marks et al., 2004).

Der Bereich zwischen zwei Nukleosomen („*linker*“-DNA) wird durch ein weiteres Histon H1 besetzt, welches am Aufbau höherer Strukturen beteiligt ist. Die Länge der „*linker*-DNA“ ist variabel und spielt eine Rolle in der Genregulation.

1.4.2 Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs)

Histone sind sehr basisch und besitzen ein aminoterminalen lysinreiches Ende. Diese Lysinreste können durch Phosphorylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung und Acetylierung modifiziert werden. Die Modifikation dieser N-terminalen Histonschwänze beeinflusst nicht nur die Interaktion der DNA mit den Histonen, sondern auch mit transkriptionsregulatorischen nicht-nukleosomalen Proteinkomplexen bzw. Transkriptionsfaktoren (Marks et al., 2004; Roth et al., 2001; Kouzarides, 2000).

Histon Acetyltransferasen (HATs) und Histon Deacetylasen (HDACs) bestimmen den Acetylierungsstatus der Histone und beeinflussen damit die Regulation der Genexpression. HATs sind mit der Aktivierung, HDACs mit der Hemmung der Transkription verbunden. HATs binden nicht direkt an die DNA, sondern werden von Transkriptionsfaktoren an die Promotoren geführt (Kouzarides, 2000) und neutralisieren die positive Ladung der Lysine am Histonschwanz durch Acetylierung. HDACs werden ebenfalls von Transkriptionsfaktoren rekrutiert und können so durch die Entfernung der neutralisierenden Acetylierung zur Kondensation des Chromatins beitragen (Marks et al., 2004; Gregory et al., 2001).

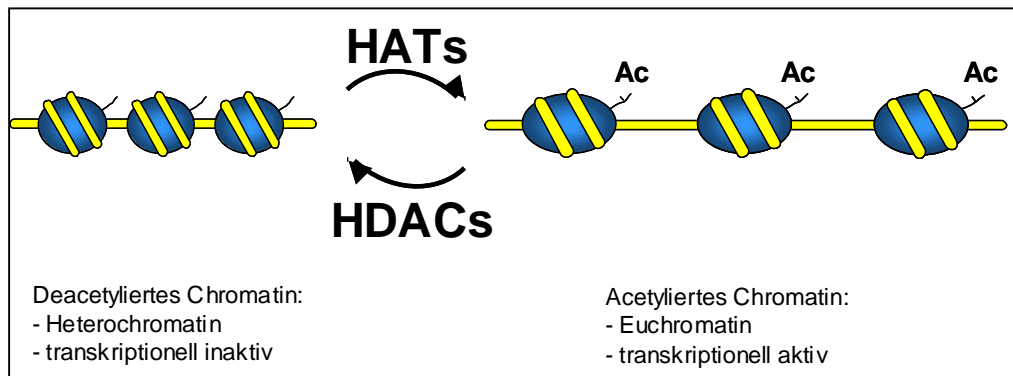


Abb.1.4: Schematische Darstellung des Gleichgewichts zwischen HATs und HDACs. Die N-terminalen Enden der Histone eines Nucleosoms stehen frei zugänglich aus dem Nucleosom hervor. Die Acetylierung bestimmter Lysinreste führt zu „offenem“ Chromatin, das den Zugang der Transkriptionsmaschinerie erleichtert. Die Entfernung der Acetylreste durch HDACs führt wiederum zu „geschlossenem“ Chromatin und transkriptioneller Inaktivität.

1.4.3 HDACs und Gebärmutterhalskrebs

Störungen in der HAT- oder HDAC-Aktivität sind mit der Entwicklung von Krebs assoziiert (Wolffe et al., 2000; Mahlknecht and Hoelzer, 2000; Timmermann et al., 2001). Gene, die für HAT-Enzyme kodieren, sind in verschiedenen Krebsarten überexprimiert und/oder mutiert (Marks et al., 2004). Ein Ungleichgewicht in der Histonacetylierung führt zu Veränderungen in der Chromatinstruktur und zur transkriptionellen Dysregulation von Genen, die in der Zellzyklus-Kontrolle, Differentiation und/oder Apoptose eine entscheidende Rolle spielen (Marks et al., 2004).

Nicht nur zelluläre Transkriptionsfaktoren können mit HAT und HDAC Molekülen interagieren, sondern auch virale Onkoproteine, wie E6 und E7 der „high risk“ HPV (zur Hausen, 2002; Schlegel et al., 1988). E6 kann durch die Bindung an p300 dessen intrinsische HAT-Aktivität modulieren und dadurch indirekt die Transaktivierung von p53- und NF- κ B-abhängigen Promotorelementen herabsetzen (Patel et al., 1999). Das E7-Protein kann über ein Brückenprotein (Mi2 β) indirekt an den HDAC-Komplex binden (Brehm et al., 1999). Diese Fähigkeit ermöglicht es E7, zelluläre Gene, die inkompatibel mit der Entwicklung von zervikalem Krebs sind, zu inaktivieren.

Darüber hinaus konkurriert E7 mit HDACs um die Bindung an pRB (Brehm et al., 1999; Brehm et al., 1998). HDAC und RB bilden zusammen einen Repressorkomplex, der an Promotoren von S-Phase-spezifischen Genen bindet und dabei die E2F vermittelte Transkription hemmt. Dissoziation des Repressorkomplexes durch die Bindung von E7 an pRB führt zur Freisetzung von E2F (Brehm et al., 1999) und induziert die Transkription von proliferationsfördernden Genen.

1.4.4 HDAC Inhibitoren

Im Menschen wurden achtzehn HDACs identifiziert, die – anhand ihrer Homologie zu HDACs in Hefen, ihrer subzellulären Lokalisation und ihrer enzymatischen Aktivität - in vier unterschiedliche Klassen eingeteilt sind. Klasse I HDACs sind Homolog zum Hefe RPD3 Protein, hauptsächlich im Zellkern zu finden und zeigen ubiquitäre Expression in vielen unterschiedlichen humanen Zelllinien und Geweben. HDACs der Klasse II teilen Homologien mit dem Hda1 Hefe-Protein und pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma. Klasse III HDACs hingegen unterscheiden sich strukturell wesentlich von den HDACs anderer Klassen und werden im Kontext von HDAC Inhibitoren stets außer Acht gelassen. Allein HDAC 11 ist als Klasse IV HDAC klassifiziert. Es weist zwar Ähnlichkeiten mit den katalytischen Domänen der Klasse I und Klasse II Enzyme auf, diese ist aber zu gering für eine Einordnung in eine dieser Klassen (Bolden et al., 2006; Minucci and Pelicci, 2006).

Die Fähigkeit strukturell diverser HDAC Inhibitoren die Aktivität unterschiedlicher HDAC Klassen spezifisch zu inhibieren, ist in Abb.1.5 dargestellt.

HDACs zählen zu den vielversprechendsten Angriffszielen bei der Entwicklung neuer Krebstherapeutika. Eine große Anzahl strukturell diverser HDAC Inhibitoren wurde aus natürlichen Quellen isoliert oder synthetisch hergestellt. Diese haben in den vergangenen Jahren aufgrund ihrer Eigenschaft, Differenzierung, Wachstumsarrest und Apoptose in verschiedenen Krebsarten zu induzieren, große Aufmerksamkeit erlangt. Die gleichzeitig sehr geringe Toxizität gegenüber normalen Zellen hat zur Einführung dieser Substanzen in Klinische Studien geführt.

Bei der klassischen Suche nach Angriffszielen in der Krebstherapie kämen HDACs eigentlich nicht in Frage, denn theoretisch würde die HDAC Inhibition zu sehr unspezifischen Effekten führen. Allerdings wurden HDAC Inhibitoren bereits eingesetzt bevor HDACs selbst überhaupt entdeckt wurden (Minucci and Pelicci, 2006). Die krebshemmende Aktivität von Butyrat zum Beispiel wurde zunächst seiner Eigenschaft zugeschrieben, Differenzierung zu induzieren (Leder et al., 1975). Erst später wurde festgestellt, dass Butyrat Hyperacetylierung der Histone induziert (Riggs et al., 1977) obwohl zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar war, dass HDACs die Zielmoleküle sind. Erst in den 1990ern wurde eine klare Verbindung zwischen Hemmung von Tumorwachstum und Inhibition von HDAC Aktivität hergestellt (Yoshida et al., 1990; Richon et al., 1998).

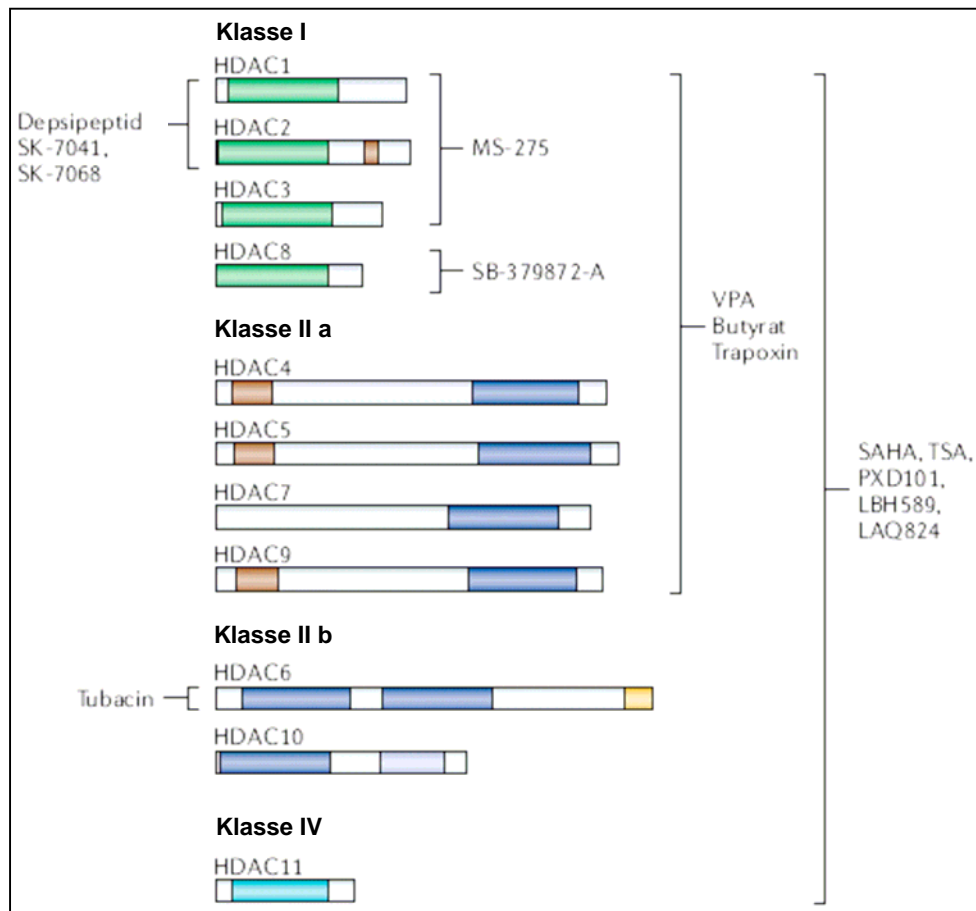


Abb.1.5: HDAC Klassen und ihre Inhibitoren. Dargestellt sind Klasse I HDACs (1, 2, 3 und 8), Klasse IIa (4, 5, 7 und 9), Klasse IIb (6 und 10) und HDAC 11 der Klasse IV. Die katalytischen Domänen der einzelnen Klassen sind farbig markiert (grün für Klasse I, blau für Klasse II und türkis für Klasse IV). Die „Coiled-coil“ Region ist braun gekennzeichnet. Orange stellt den Zink-Finger dar. Die strukturell diversen HDAC Inhibitoren mit ihrer Eigenschaft spezifisch bestimmte HDAC Klassen zu inhibieren sind ebenfalls eingezeichnet. (Bolden et al., 2006)

2. Zielsetzung

Humane Papillomviren, die eine kausale Rolle in der Entwicklung von Zervixkarzinomen spielen (zur Hausen, 2002), haben verschiedene Strategien entwickelt, um die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose zu verhindern, zum Beispiel in dem sie mit dem TNF α Signalweg interferieren (Filippova et al., 2002; Finzer et al., 2002).

In vorhergehenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass HDAC Inhibitoren in Zervixkarzinomzellen den intrinsischen Weg der Apoptose induzierten, wobei eine Beteiligung von Todesrezeptoren zweifelsfrei ausgeschlossen werden konnte. Der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials wurde begleitet von einer zeitabhängigen Degradation des Retinoblastomproteins pRB, was in der Freisetzung von E2F-1 resultierte. Diese E2F-1 Freisetzung war abhängig von der Expression des viralen Onkoproteins E7 und führte zu der Induktion des pro-apoptischen p53-Homologs p73 und schließlich zum intrinsischen Zelltod (Finzer et al., 2004; Finzer et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit war es nun, in Zervixkarzinomzellen den Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Todesrezeptor-induzierte Apoptose bei zusätzlicher Stimulation dieser Rezeptoren im Detail zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die HPV 18-positive Zervixkarzinomzelllinie HeLa als Modellsystem verwendet. Als HDAC-Inhibitor wurde Natriumbutyrat ausgewählt.

In diesem Zusammenhang sollte die therapeutische Relevanz von HDAC-Inhibitoren für einen möglichen Einsatz in der Behandlung von Zervixkarzinomen untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid/bis-Acrylamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	Fluka BioChemika
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BenchMark™ (Proteinmarker)	Gibco Life Technologies
Blue Dextran	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovine-Serum-Albumine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete™ inhibitors	Roche Diagnostics, Mannheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiotreitol (DTT)	Gibco, Eggenstein
DMEM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA Markers	Gibco Life Technologies
ECL-Reagenz	Amersham-Pharmacia, Freiburg
EDTA-Na ₂	Roche Diagnostics, Mannheim
Essigsäure, p.a. (100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Fetales-Kälberserum	Gibco Life Technologies
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd, 37 %	Merck, Darmstadt
Glyzerin p.a. 87 %	Merck, Darmstadt

Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, technisch	BASF Ludwigshafen
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet TM P40, 10 %	Roche Diagnostics, Mannheim
PBS	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Pefabloc SC TM	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, Eggenstein
PolyFect TM Transfection Reagent	Quiagen, Hilden
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
2-Propanol, Isopropanol	Merck, Darmstadt
RPMI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure, konz. 37 %, p.a.	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma, Deisendorf
TEMED	Sigma, Deisendorf
TNF α	Strathmann Biotech, Hannover
TNF α -Antikörper	BD Biosciences Pharmingen
Triton X-100 TM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20 TM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco Life Technologies, Eggenstein

3.1.2 Laborausstattung

Analytikwaage (2004 MP)	Sartorius, Göttingen
Waage (1216 MP)	Sartorius, Göttingen
Blotkammer (semi-dry; Hoefer, SemiPhor)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Centrifuge 2K15	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Electrophoresekammer, horizontal	Renner, Darmstadt
Electrophoresekammer, vertikal (Hoefer SE600)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Inkubator (für Zellkultur)	Heraeus, Hanau
Mikroskop CK2	Olympus
Minifuge	Heraeus, Hanau
Mini-PROTAN II (Western Minigel)	BioRad, München
Neubauer Zählkammer	Bender & Hobein, Bruchsal
pH-meter Calimatic 765	Knick
Photometer Ultraspec 3000	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Power supply EPS 600	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Sonifier 250	Branson/Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Centricon T-1065	Kontron, München
Reaktionsgefäß-Mischer	Heidoph, Rust

3.1.3 Arbeitsmaterialien

Autoradiographie-Kassetten	Sigma, Deisenhofen
Hyperfilm TM ECL	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Zellkultur Flaschen	Greiner, Nürtingen
Zellkultur Platten	Greiner, Nürtingen
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher & Schüll, Dassel
Glaspipetten	Renner, Darmstadt

Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen
Plastikküvetten, 1 mL	Greiner, Nürtingen
Plastikspritzen, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
PVDF Membrane (Immobilon P; 0,5 µm)	Millipore, Eschborn
Sterilfilter, 0,2 µm	Millipore, Eschborn
Pipettenspitzen	Steinbrenner, Heidelberg

3.1.4 Lösungen

Blocking-Puffer (Western)	TBS + 5 % Milch
Puffer A (Kernextrakte)	10 mM HEPES, pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA, pH 8 0,1 mM EGTA, pH 8
Puffer B (Kernextrakte)	10 mM Tris pH 7,5 7 M Harnstoff 20 mM EDTA, pH 8 1 % SDS 0,3 M Natriumacetat, pH 4,8
Puffer C (Kernextrakte)	20 mM HEPES pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA, pH 8 1 mM EGTA, pH 7,9
DEPC H ₂ O	0,1 % Diethylcarbonat

Laemmli Puffer (10 x)	0,25 M Tris Base 1,9 M Glycin 1 % SDS
Pefabloc SC	23,8 mg/ml (Stocklösung)
PBS	123 mM Natriumchlorid 7,6 mM di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,2-7,8
Polyacrylamidgel: Sammelgel (4 %)	0,22 M Tris/HCl pH 6,8 0,1 % SDS 4 % Acrylamid/Bisacrylamid 0,5 % Ammoniumpersulfat 0,16 % TEMED
Polyacrylamidgel: Trenngel (7-15 %)	0,22 M Tris/HCl pH 6,8 0,1 % SDS 7-15 % Acrylamid/Bisacrylamid 0,5 % Ammoniumpersulfat 0,7 % TEMED
Ponceau-Rot-Lösung	0,2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
RIPA -Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP40 0,1 % SDS

SSC (20 x)	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitratdihydrat
TBE (10x)	0,9 M Tris Base 0,9 M Borsäure 0,02 M EDTA pH 8
TBS (1 x)	20 mM Tris/HCl 137 mM NaCl 1 M HCl pH 7,6
TBS-T (1 x)	20 mM Tris/HCl 137 mM NaCl 1 M HCl pH 7,6 0,01 % Tween 20
TE (1 x)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
TNF α	100 U/ μ L Stocklösung 10 μ g (=10 ⁶ U) 200 μ L bidest. Wasser 9,8 mL DMEM (inklusive FKS) Lagerung: -70°C
Towbin Puffer (10x)	0,25 M Tris Base 1,9 M Glycin

Transferpuffer (Western Blot)	1x Towbin Puffer 10 % Methanol
Proteinladepuffer (5x)	10 % SDS 0,02 % Bromphenolblau 12,5 % 2-Mercaptoethanol 0,3 M Tris/HCl pH 6,8 5 mM EDTA pH 8 50 % Glycerol zur Lösung auf 37 °C erhitzen

3.1.5 Antikörper für Western Blot

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Actin; clone C4; mouse monoclonal; Code 691001; Lot# 7010 F ICN Biomedicals	1:200000	Anti-Mouse IgG-HRP; W402B 16066001 Promega	1:5000
Bcl-3 (C-14); sc-185; Lot# I0805; rabbit polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Anti Rabbit IgG-HRP; V401B 14237031 Promega	1:5000
IκB-α/MAD-3 (C-21); sc-371; Lot# H076; rabbit polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Anti Rabbit IgG-HRP; V401B 14237031 Promega	1:5000
Caspase 8 (C-15) Peter H. Krammer	1:10	Isotype specific IgG2b-HRP; sc-2062; Lot #A279 Santa Cruz Biotechnology	1:10000
c-FLIP (NF-6) Peter H. Krammer	1:10	Isotype specific IgG1-HRP; sc-2060; Lot#F252 Santa Cruz Biotechnology	1:10000

M2 PK; Lot#03; S-1; mouse monoclonal IgG1; ScheBo Tech	1:1000	Isotype specific IgG1-HRP; sc-2060; Lot#E3006 Santa Cruz Biotechnology	1:10000
p21 anti Cip/WAF; Cat. 610234; Lot#52561; mouse polyclonal Becton, Dickinson and Company	1:1000	Isotype specific IgG1-HRP; sc-2060 Lot#E3006 Santa Cruz Biotechnology	1:10000
p50 (E-10); sc-8418; Lot# D012; mouse monoclonal IgG1 Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Isotype specific IgG1-HRP; sc-2060; Lot#E3006 Santa Cruz Biotechnology	1:10000
p53 (DO-1); sc-126; Lot# J2804; mouse monoclonal IgG2a Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Isotype specific IgG2a- HRP; sc-2970; Lot#H0504 Santa Cruz Biotechnology	1:10000
p65 (F-06); sc-8008; Lot# D042; mouse monoclonal IgG1 Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Isotype specific IgG1-HRP; sc-2060; Lot#E3006 Santa Cruz Biotechnology	1:10000
RB; Cat. 554136; Lot#52561; mouse polyclonal Becton, Dickinson and Company	1:1000	Isotype specific IgG1-HRP; sc-2060; Lot#E3006 Santa Cruz Biotechnology	1:10000
SP-1 (PEP2) X; sc-59X; Lot# J238; rabbit polyclonal Santa Cruz Biotechnology	1:5000	Anti Rabbit IgG-HRP; V401B 14237031 Promega	1:5000

3.1.6 Enzyme

DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)
Superscript II Reverse Transcriptase™
T4 DNA-Polynukleotidkinase
Taq DNA-Polymerase

New England Biolabs, Schwalbach
Invitrogen, Karlsruhe
New England Biolabs, Schwalbach
Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Größen-Marker

Protein-Standard Benchmark™
DNA-Standard GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder
DNA-Ladepuffer 6x Loading Dye Solution

MBI Fermentas, Vilnius
MBI Fermentas, Vilnius
Gibco, Eggenstein

3.1.8 Kits

Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
HexaLabel Plus™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas, Vilnius
HiPerFect™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
QIAquick™ Gel extraction Kit	Qiagen, Hilden

3.1.9 Plasmid

Das FLAG-c-FLIP_L Plasmid stammt von David Huang (WEHI, Melbourne, Australien) und Carsten Scaffidi (Scaffidi et al., 1997).

3.1.10 Zellen

Zell-Linie	Charakteristika
HeLa	<i>Spezies:</i> human/ weiblich/ adult <i>Gewebe:</i> Zervix/ Adenokarzinom <i>Viraler Status:</i> HPV 18-positiv (ca. 50 Kopien pro Zelle) <i>In vivo Phänotyp:</i> tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> aneuploid <i>Referenz:</i> (Boshart et al., 1984; Schwarz et al., 1985)
444	HeLa-Fibroblasten- Hybridzell-Linie <i>Viraler Status:</i> HPV 18-positiv <i>In vivo Phänotyp:</i> nicht-tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> tetraploid <i>Referenz:</i> (Stanbridge, 1988)
CGL3	HeLa-Fibroblasten- Hybridzell-Linie (Segreganten von 444) <i>Viraler Status:</i> HPV 18-positiv <i>In vivo Phänotyp:</i> tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> tetraploid <i>Referenz:</i> (Stanbridge, 1988)
C4I	<i>Spezies:</i> human/ weiblich/ adult <i>Gewebe:</i> Zervix/ Adenokarzinom <i>Viraler Status:</i> HPV 18-positiv (1 Kopie pro Zelle) <i>In vivo Phänotyp:</i> tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> aneuploid <i>Referenz:</i> (AUERSPERG and HAWRYLUK, 1962)

SW756	<p><i>Spezies:</i> human/ weiblich/ adult <i>Gewebe:</i> Zervix/ Adenokarzinom <i>Viraler Status:</i> HPV 18-positiv (ca. 15-20 Kopien pro Zelle) <i>In vivo Phänotyp:</i> tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> aneuploid <i>Referenz:</i> (Freedman et al., 1982)</p>
SiHa	<p><i>Spezies:</i> human/ weiblich/ adult <i>Gewebe:</i> Zervix/ Adenokarzinom <i>Viraler Status:</i> HPV 16-positiv (ca. 1-2 Kopien pro Zelle) <i>In vivo Phänotyp:</i> tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> aneuploid <i>Referenz:</i> (Baker et al., 1987)</p>
CaSki	<p><i>Spezies:</i> human/ weiblich/ adult <i>Gewebe:</i> Zervix/ Adenokarzinom <i>Viraler Status:</i> HPV16-positiv (ca. 500 Kopien pro Zelle) <i>In vivo Phänotyp:</i> tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> aneuploid <i>Referenz:</i> (Baker et al., 1987)</p>
C33a	<p><i>Spezies:</i> human/ weiblich/ adult <i>Gewebe:</i> Zervix/ Adenokarzinom <i>Viraler Status:</i> HPV negativ <i>In vivo Phänotyp:</i> tumorigen bei s.c. Injektion in <i>nu/nu</i> Mäuse <i>Karyotyp:</i> aneuploid <i>Referenz:</i> (Yee et al., 1985)</p>
H1299	<p><i>Spezies:</i> human/ männlich/ adult <i>Gewebe:</i> Lunge/ NSCL-Karzinom <i>Viraler Status:</i> HPV negativ <i>Referenz:</i> (Giaccone et al., 1992)</p>
U2OS	<p><i>Spezies:</i> human/ weiblich/ adult <i>Gewebe:</i> Knochen/ Osteosarkom <i>Viraler Status:</i> HPV negativ <i>Karyotyp:</i> aneuploid <i>Referenz:</i> (Heldin et al., 1986)</p>

3.1.11 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

CD95L	Alexis Biochemicals
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Eggenstein
Geneticin (G418)	Calbiochem, Bad Soden
MG132	Calbiochem, Bad Soden
Natriumbutyrat	Sigma, Deisenhofen
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Gibco, Eggenstein
Puromycin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α)	Strathmann Biotec AG
TNF- α neutralisierender Antikörper	BD Biosciences Pharmingen
TRAIL	(Keogh et al., 2000)
Trichostatin A (TSA)	Sigma, Deisenhofen
Einfriermedium	10 % DMSO 30 % FKS 60 % DMEM sterilfiltriert durch 0,22 μ m Filter
Trypanblau-Lösung	0,25 % Trypanblau in PBS sterilfiltriert durch 0,22 μ m Filter

3.1.12 Nukleotide und Oligonukleotide

[α - 32 P] dCTP (10mCi/mL)

Amersham-Pharmacia, Braunschweig

[γ - 32 P] dATP (10mCi/mL)

Amersham-Pharmacia, Braunschweig

Desoxy-Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dCTP)

Roche Diagnostics, Mannheim

Gen	Primer-Sequenz	Annealing-Temperatur	PCR-Zyklen
<i>c-FLIP_L</i>	vorwärts: 5'-TACATGGGCCGAGGCAAGATAA-3' rückwärts: 5'-ATAGCCCAGGGAAGTGAAGGTGTC-3'	65 °C	30
<i>c-FLIP_S</i>	vorwärts: 5'-ACCCTCACCTTGTTTCGGACTAT-3' rückwärts: 5'-CCAAGAATTTTCAGATCAGGACAA-3'	65 °C	30
<i>p50</i>	vorwärts: 5'-CTGGAAGCACGAATGACAGA-3' rückwärts: 5'-TTTCAAGTTGGATGCATTGG-3'	58 °C	30
<i>p65</i>	vorwärts: 5'-CGACCTGAATGCTGTGCGGC-3' rückwärts: 5'-GATCTCATCCCCACCGAGGC-3'	66 °C	30
<i>GAPDH</i>	vorwärts: 5'-TGGATATTGTTGCCATCAATGACC-3' rückwärts: 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCATG-3'	65 °C	20

3.2. Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verschiedenen humanen Zelllinien wurden als adhärent wachsende Kulturen in Zellkulturflaschen aus Kunststoff bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank bei 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Kulturmedium diente DMEM („*Dulbecco's modified Eagle Medium*“), dem 10 % fetales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurde die Kultur routinemäßig geteilt. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen sich makroskopisch ablösten. Die Trypsinierung wurde mit Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension 1:3 bis 1:30 verdünnt ausgesät.

3.2.1.1 Kryokonservierung von Säugerzellen

Um humane Zelllinien dauerhaft zu lagern, wurde eine subkonfluente Kultur trypsiniert, die Zellen für 5 min bei 1.500 rpm und 4 °C (Varifuge RF) sedimentiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium (DMEM, 30 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert (1×10^6 Zellen/mL). In Kryogefäße aliquotiert, wurde die Suspension erst langsam auf -70 °C gekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff bei -190 °C dauerhaft gelagert.

Zur Wiederaufnahme der Kultivierung wurden die gefrorenen Röhrchen direkt in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde das DMSO-haltige Einfriermedium entfernt, indem die Suspension in 10 mL DMEM aufgenommen und die Zellen für 5 min bei 1.500 rpm und 4 °C (Varifuge RF) sedimentiert wurden. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche (25 cm²) ausgesät. Einen Tag später erfolgte routinemäßig ein Mediumwechsel.

3.2.1.2 Aussaat von Säugerzellen für Experimente

Zum Aussäen der humanen Zelllinien für Experimente am darauf folgenden Tag wurde eine Probe einer subkonfluenten Stammkultur nach Trypsinierung mit Trypanblau (50 % Zellsuspension/ 50 % Trypanblaulösung) angefärbt und ihre Konzentration mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden vier Großquadrate ausgezählt und an Hand des Durchschnittswertes die Zelldichte berechnet: $(\text{durchschnittliche Zellzahl/Großquadrat}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \times \text{mL}^{-1} = \text{Zelldichte (Zellzahl/mL)}$. Anhand der Berechnung wurde die Zellsuspension in Kulturmedium verdünnt und in Schalen geeigneter Größe ausgesät. Dabei wurde die Zelldichte in allen Versuchen konstant gehalten. Sie betrug abhängig von Größe und Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen $0,25 - 0,5 \times 10^5$ Zellen/cm².

3.2.2 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion humaner Zelllinien mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Transfektions-Reagenz Effectene™ (Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers vorgenommen. Die Wirkung des nicht-liposomalen Reagenz basiert auf der Ausbildung von Micellen-Strukturen, die negativ geladene DNA-Moleküle einschließen und damit deren Eintritt in die Zellen unterstützen.

3.2.2.1 Stabile Transfektion und klonale Selektion

Zur Generierung stabil transfizierter Zelllinien wurden 60-70 % konfluente Kulturen in 6 cm Schalen mit dem Transfektions-Reagenz Effectene™ (Qiagen) transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Selektion in eine 250 ml Flasche umgesetzt und dem Kulturmedium 1,0 mg/ml G418 oder 1,0 µg/ml Puromycin zugefügt. Während des etwa 8-14 Tage dauernden Selektionsprozesses wurden abgestorbene Zellen nach jeweils 1-2 Tagen durch Waschen mit PBS und Erneuern des Kulturmediums entfernt und die überlebenden Zellen nach 3-4 Tagen neu ausgesät. Klonale Zelllinien wurden generiert, indem die Zellen nach Durchlaufen der Selektion in absteigender Verdünnungsreihe in 96-Loch-Platten ausgesät und auf einzelnen Zellen basierende Kolonien vermehrt wurden.

3.2.3 Präparation und Analyse von Proteinen

3.2.3.1 Kern-Cytoplasma-Trennung

Mittels Kern-Cytoplasma-Trennung wurden aus Säugerzellen cytoplasmatische bzw. Kernproteine extrahiert (Schreiber et al., 1989). 90-100 % konfluente Zellen wurden in einer 10 cm Kulturschale zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um das Kulturmedium und abgestorbene Zellen möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit 1,6 mL hypotonischem Puffer A, inklusive frisch zugegebener Inhibitoren (Tabelle 3.1), versetzt und mit dem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und zum hypotonen Anschwellen der Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 0,05 % (w/v) des nicht-ionschen Detergenz NP40 (Nonidet™ P40) und Mischen auf dem Reaktionsgefäß-Mischer für 10 sec wurde die Plasmamembran der Zellen lysiert und das Cytoplasma freigesetzt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm (2K15, Sigma) und 4 °C befanden sich die cytoplasmatischen Proteine im Überstand, während das Sediment die intakten Kerne enthielt.

Für die Hochsalz-Extraktion der Kernproteine wurde das Sediment in 200 µl eiskaltem Puffer C, ebenfalls frisch zugegebener Inhibitoren, resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm (2K15, Sigma) bei 4 °C wurde der Überstand mit den gelösten Kernproteinen abgenommen und aliquotiert bei -70 °C gelagert.

Substanz	Funktion	Finale Konzentration
DTT	Reduktionsmittel	1 mM
PefablocSC	Serinprotease-Inhibitor	0,5 mg/mL
E64	Cysteinprotease-Inhibitor	5 µg/mL
NaF	Phosphatase-Inhibitor	1 mM
Na ₃ VO ₄	Phosphatase-Inhibitor	0,2 mM

Tabelle 3.1: Inhibitoren für die Kern-Cytoplasma-Trennung

DTT, Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden den Puffern A und C vor Gebrauch frisch zugesetzt.

3.2.3.2 Gesamtproteinextrakt (RIPA)

Bei der RIPA-Extraktion werden die gesamten Proteine der Zelle aus dem Cytoplasma, sowie aus dem Kern extrahiert. Der RIPA-Puffer (Klotz et al., 1999) enthält das Detergenz SDS, das alle Kompartimente der eukaryotischen Zelle lysiert, wodurch die gesamten Proteine extrahiert werden.

Zur Gesamtproteinextraktion wurden die 90-100 % konfluenten Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgezogen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und das PBS restlos entfernt. 500 µl RIPA-Puffer wurde auf die Zellen gegeben, für 2-5 min auf Eis inkubiert und mit einem Schaber anschließend abgelöst. Die Zellen wurden in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und sonifiziert (Duty-cycle 50%, Level 5), um die hochmolekulare DNA zu scheren. Nachdem die Suspension 30 min auf Eis inkubiert hatte, wurde bei 14000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert, um die Proteine von den Zelltrümmern zu trennen. Die Konzentration der Proteine wurde über den Bradford-Assay (BioRad) bestimmt. Anschließend konnte die Proteinlösung bis zur Analyse bei -70 °C gelagert werden.

3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Der Bradford-Assay beruht auf der Anfärbung der Proteine durch den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250. Beim Kontakt von Proteinen mit dem Farbstoff kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 595 nm, da die anionische Sulfonatform des Reagenz in einem Proteinkomplex stabilisiert wird. Die Bindung erfolgt an kationische und exponierte hydrophobe Seitenketten des Proteins.

Parallel zur Probenmessung wurde eine Eichgerade mit den Konzentrationen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µg BSA/ml erstellt.

Zu 800 µl Wasser wurden 200 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben, vermischt und bei Raumtemperatur die Absorption bei 595 nm gegen Wasser als Leerwert gemessen. Von der zu bestimmenden Proteinlösung wurden 2 µl zu 798 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben.

3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt die Proteine in Gegenwart eines Überschusses von Natriumdodecylsulfat (SDS) in einer neutralen Gelmatrix aus Polyacrylamid elektrophoretisch auf. Hier wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) verwendet, bei der die Proben zunächst in einem Sammelgel konzentriert und dann in einem Trenngel separiert werden.

Das negativ geladene Detergenz SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an hydrophobe Regionen der Aminosäurereste an. Dies kompensiert deren positive Ladungen und es kommt zur Denaturierung und Solubilisierung der Proteine. Diese wandern in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts, unabhängig von ihrem nativen Ladungszustand, mehr oder weniger schnell zur Anode und werden dabei aufgetrennt. Das polymere Netz wirkt wie ein Molekularsieb, dessen Maschengröße von der Acrylamid-Konzentration des Gels bestimmt wird.

Um eine optimale Auftrennung zu erreichen, kann der Anteil des Polyacrylamids im Trenngel von 7 bis 15 % variieren.

Für die Analyse wurde das Volumen aller Proben mit H₂O bidest. angeglichen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und im Thermomixer für 5 min auf 99 °C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden sie für 30 sec bei 13.000 rpm (Biofuge pico) zentrifugiert und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer konstanten Stromstärke gestartet, bis die Bromphenolblau-Farbstoffbande das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Stromstärke erhöht. Dabei betrug die Stromstärke bei kleinen Gelen 15 bzw. 30 mA, bei großen Gelen mit bis zu 20 Spuren 25 bzw. 50 mA. Für die spätere Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurden farbstoffgekoppelte Proteine als Größenstandards (Benchmark™) verwendet.

3.2.3.5 Western Blot Transfer

Beim Western Blot Transfer wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Hierbei blieb das Trennmuster der Proteine erhalten, so dass diese mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Western-bloß Transfer „Semi-Dry“ (Towbin et al., 1979; Gallagher et al., 2004) verwendet. Dabei wurde das Gel nach der Elektrophorese zwischen Lagen von Filterpapier (3MM, Whatman) gelegt, die mit Towbin-Puffer getränkt waren und während des Transfers als Ionenreservoir dienten. Die PVDF-Membran wurde nach Aktivierung in 100 % Methanol in H₂O bidest. gewaschen und für 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte in einer Western Blot Kammer (SemiPhor, Amersham-Pharmacia) zwischen zwei Plattenelektroden. Der Aufbau des Blots erfolgte von oben nach unten wie folgt: Kathode, 9x Filterpapier (Whatman 3MM), PVDF-Membran, Polyacrylamid-Gel, 9x Filterpapier (Whatman 3MM)

und Anode. Die Transferbedingungen für Proteine von 20-70 kDa Größe lagen bei 1,2 mA pro cm² Membran für 70 min bei 4 °C.

3.2.3.6 Ponceaurot-Färbung

Zur Überprüfung von Qualität und Quantität des Western Blot-Transfers wurden die Proteine auf der Membran optional durch Färbung mit Ponceaurot sichtbar gemacht. Dieser Farbstoff bindet reversibel an Proteine. Die Membran wurde für 1 min bei RT in Ponceaurot-Färbelösung geschwenkt und anschließend in H₂O bidest. langsam wieder entfärbt. Nach der kompletten Entfärbung wurde die Membran in TBS-T bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.7 Immunodetektion und „*Enhanced Chemoluminescence*“ (ECL)

Die indirekte Nachweismethode (Schneppenheim et al., 1991) basiert auf der Verwendung von zwei Antikörpern. Der erste erkennt spezifisch das Protein und wird seinerseits von einem zweiten, spezie-spezifischen Antikörper erkannt, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Dieses Enzym katalysiert zusammen mit Wasserstoffperoxid die Oxidation des Substrates Luminol. Das so gebildete Dioxetan ist instabil und zerfällt. Das dabei emittierte Licht wird als verstärkte Chemolumineszenz („*enhanced chemoluminescence*“, ECL) mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran zu maskieren, wurde diese für 1 h bei RT in TBS-T mit 5 % Magermilch blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (in TBS-T 5 % Magermilch) in Folie eingeschweißt auf einem Drehschüttler (Rotamax 120) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden überschüssige Antikörper durch Waschen mit TBS-T entfernt. Die Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper in TBS-T mit 5 % Magermilch erfolgte auf einem Drehschüttler für 1 h bei RT.

Der Nachweis des Zweit-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems der Firma NEN Life Science Products Inc. Dafür wurde die mit TBS-T gewaschene Membran nochmals mit TBS gewaschen und für 1 min bei RT mit einem Mix aus 50 % ECL-Reagenz I und 50 % ECL-Reagenz II inkubiert und die Chemolumineszenz durch Autoradiographie detektiert. Der Röntgenfilm wurde dabei für wenige Sekunden bis Minuten in einer Autoradiographie-Kassette bei Raumtemperatur exponiert und maschinell (CURIX 60, Agfa) entwickelt.

Als Kontrolle für gleichmäßige Beladung und Transfer des Gels wurde bei jedem Experiment stets zusätzlich Actin nachgewiesen.

3.2.3.8 „*Stripping*“ und Lagerung der PVDF-Membran

Zur Detektion verschiedener Proteine auf einer Membran wurden die gebundenen Antikörper durch „*stripping*“ mit Natronlauge von den Proteinen abgespalten, wobei die Epitope der Proteine für eine erneute Antikörperbindung erhalten blieben. Die PVDF-Membran wurde zuerst jeweils für 5 min in TBS und H₂O bidest. gewaschen, um dann die

gebundenen Antikörper durch Schwenken für 5 min in 0,2 M NaOH abzuspalten. Anschließend wurde die Membran wieder für 5 min in H₂O bidest. und danach in TBS gewaschen. Nach dem „*stripping*“ wurde die Membran erneut blockiert und mit einem anderen Erst-Antikörper inkubiert.

3.2.4 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch (Ultrospec III) durch Messung der Absorption bei 260 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) bestimmt. Hierfür wurde die DNA- oder RNA-Lösung mit H₂O bidest. verdünnt in einer Quarzküvette gegen einen Nullwert mit H₂O bidest. gemessen. Die Extinktion von 1,0 entspricht bei ds DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei ss DNA 40 µg/ml, bei DNA-Oligonukleotiden 33 µg/mL und bei RNA 40 µg/ml (Sambrook and Gething, 1989).

Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung zu ermitteln, wurden die Proben auch bei 280 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Proteinen und aromatischen Verbindungen) vermessen. Der Quotient beider Wellenlängen (OD 260 nm/ OD 280 nm) sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur elektrophoretischen Auftrennung und Analyse von Nukleinsäuren eingesetzt. Da diese auf Grund ihrer Phosphat-Reste bei allen pH-Werten negativ geladen sind, wandern sie in der neutralen Gelmatrix aus Agarose in Abhängigkeit ihrer Größe zur Anode. Um den Auftrennungsgrad von hoch- bzw. niedermolekularen Nukleinsäuremolekülen zu optimieren, wurde dabei die Agarosekonzentration von 1 bis 2 % (w/v) variiert.

Die Nukleinsäuremoleküle wurden schließlich unter Verwendung des interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert.

Zur Herstellung eines horizontalen, nativen DNA-Gels wurde Agarose mit 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlen auf etwa 60 °C 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Lösung wurde zum Erkalten in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen und anschließend mit 1x TAE-Puffer aufgefüllt.

Die Elektrophorese von RNA erfolgte im Gegensatz zur DNA unter denaturierenden Bedingungen in 1x MOPS-Puffer in 1 % (w/v) Agarosegelen. Um eine Kontamination mit RNasen und den damit verbundenen Abbau der RNA zu vermeiden, wurde die Gelapparatur mitsamt des Gelschlittens und der Kämme mit NaOH vorbehandelt. Die Proben wurden mit 1x DNA-/RNA-Ladepuffer versetzt. Die Denaturierung der RNA erfolgte durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min. Als Größen-Standard wurde für DNA eine 100 bp Fragment-Leiter

(GeneRuler™ 100 bp Ladder) verwendet. Bei RNA-Gelen wurden die Banden der ribosomalen 18S und 28S RNA für den Größenvergleich herangezogen. Die Agarosegele wurden routinemäßig bei konstanter Spannung von 5-8 V/cm gefahren. Das Trennmuster wurde unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) auf einem Transilluminator visualisiert und zur Dokumentation fotografiert.

3.2.4.3 RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit dem TRIZOL Reagenz (Gibco, Life Technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Hierzu wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen pelletiert (5 min, 1500 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml TRIZOL Reagenz aufgenommen. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT erfolgte die Zugabe von 200 μl Chloroform. Die Probe wurde kräftig vermischt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch die Zugabe von 500 μl Isopropanol präzipitiert. Nach 10 min wurde die Probe für weitere 10 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 75 % Ethanol gewaschen und nochmals 10 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Nach dem Trocknen bei RT wurde das Pellet in 50 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten RNA photometrisch bestimmt (O.D. bei 260 nm).

Alternativ wurde RNA mit Hilfe des RNeasy Kit (Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers isoliert.

3.2.5 Northern Blot Analyse

Bei der Northern Blot Analyse (Southern, 1975) wird RNA durch Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Der qualitative sowie quantitative Nachweis von RNA wird anschließend durch Hybridisierung der Membran mit [^{32}P]-markierten DNA-Sonden und Autoradiographie durchgeführt.

Die Nylonmembran (GeneScreen Plus) wurde zunächst für 1 min in H_2O bidest. aktiviert und anschließend zusammen mit dem Gel für 15 min in 20x SSC-Puffer äquilibriert. Der Transfer-Aufbau erfolgte von unten nach oben: 1x Stapel Papiertücher, 4x Filterpapiere (Whatman 3MM) mit 20x SSC befeuchtet und die äquilibrierte Nylonmembran. Auf die Membran wurde das Agarose-Gel luftblasenfrei aufgelegt. Um ein Austrocknen des Gels während des Transfers zu vermeiden wurde der gesamte Aufbau in Frischhaltefolie verpackt und anschließend mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Durch die Kapillarwirkung des Puffers wurde die DNA über Nacht auf die Nylonmembran transferiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran 5 min in 2x SSC gewaschen, bei RT getrocknet und entweder bei 4 °C gelagert oder direkt für die Hybridisierung verwendet.

3.2.5.1 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Der qualitative und quantitative Nachweis der RNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer komplementären radioaktiv-markierten DNA-Sonde. Die Markierung der als Sonde verwendeten DNA-Fragmente mit [³²P] wurde mit Hilfe des HexaLabel Plus™ DNA Labeling Kit (MBI Fermentas) nach dem Prinzip des „*random priming*“ (Feinberg and Vogelstein, 1983) vorgenommen. Diese Methode verwendet Zufalls-Hexanucleotid-Primer („*random primer*“) als Startstellen. Die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) wurde zur Synthese der komplementären mit [α -³²P] dCTP markierten DNA-Stränge eingesetzt, die schließlich als Sonde für die Hybridisierung verwendet wurden.

3.2.5.2 Radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde

Als Hybridisierungssonde wurden linearisierte Plasmide bzw. durch Insert-Excision gewonnene cDNAs verwendet. Für die Markierung wurden 50-100 ng des gereinigten DNA-Fragmentes für 5 min bei 99 °C im Themomixer denaturiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1x Reaktionspuffer, einem Mix aus drei unmarkierten dNTPs (dATP, dGTP und dTTP), 25 μ Ci [α -³²P] dCTP und 1 U Klenow-Fragment, wurde die Probe für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Polymerase-Reaktion mit 1x Vol. 2x TNE-Puffer gestoppt. Abschließend wurde die markierte Sonde über eine Chromatographie-Säule (MicroSpin G25) von Salzen und überschüssigen Nukleotiden befreit.

3.2.5.3 Hybridisierung der Membran

Freie Bindungsstellen wurden unspezifisch mit tRNA gesättigt, indem die Membranen vor Zugabe der radioaktiv markierten Sonde mit 10 ml Hybridisierungspuffer pro Röhre für 2-4 h bei 42 °C präinkubiert wurden. Die Sonde wurde für 5 min bei 99 °C denaturiert, 1-2 min auf Eis gestellt und nach der Prähybridisierung direkt zum Hybridisierungspuffer hinzugegeben. Die Membran wurde unter Rollen für 24-48 h bei 42 °C (Hybrid Mini 38) inkubiert. Anschließend wurde unspezifisch gebundene DNA durch mehrmaliges stringentes Waschen bei 68 °C mit Hybridisierungswaschpuffer entfernt, die Membran auf Filterpapier (3MM Whatman) getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt. Nach dem Waschen wurde die hybridisierte RNA durch Autoradiographie visualisiert. Die Röntgenfilme wurden dabei für wenige Stunden bis einige Tage in einer Metallkassette bei -70 °C exponiert und anschließend entwickelt.

3.2.6 Semiquantitative RT-PCR Analyse

Die Reverse Transkriptions Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde zum semi-quantitativen Nachweis von mRNA eingesetzt. Die Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-

abhängige DNA-Polymerase, schreibt dabei die RNA in komplementäre cDNA um, welche quantitativ das ursprüngliche Expressionsmuster widerspiegelt. Nach Amplifikation der cDNA durch semiquantitative PCR und Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden Rückschlüsse auf die Menge der mRNA-Spezies gezogen.

3.2.6.1 Reverse Transkription von RNA

Zur Synthese von cDNA auf Basis von cytoplasmatischer RNA wurde die Reverse Transkriptase Superscript II (RNase H-) verwendet. Als Initiationsstellen für die Polymerase-Reaktion dienten Oligo-dT-Primer, mit einer Kettenlänge von 22 Nukleotiden (dT₂₂). Für die Reaktion wurden 2 µg RNA mit 20 mM Oligo-dT-Primer für 10 min bei 70 °C angelagert. Nachdem die Proben zusammen mit RT-Puffer, 10 mM DTT und 10 mM dNTP-Mix (Roche) für 10 min bei 25 °C inkubiert wurden, erfolgte die Polymerase-Reaktion nach Zugabe von 100 U Superscript II für 50 min bei 42 °C sowie für weitere 15 min bei 70 °C.

3.2.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR) ermöglicht die spezifische exponentielle Amplifikation einer definierten von zwei Oligonukleotid-Primern begrenzten DNA-Sequenz (Mullis et al., 1992). In Kombination mit der RT-Reaktion wurde die PCR zum semiquantitativen Nachweis von mRNA verwendet.

Für den Reaktionsansatz wurden 1 µl der 20 µl RT-Reaktion, je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 400 mM Vorwärts-/Rückwärts-Primer, PCR-Puffer und 0,5 U Taq-Polymerase in 50 µl Volumen eingesetzt. Die PCR wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäßen in einem PTC-200 Thermocycler durchgeführt. Zunächst wurde die cDNA für 4 min bei 94 °C denaturiert. Darauf folgte ein dreistufiger Zyklus, der 20 bis 30 mal wiederholt wurde: im ersten Schritt wurde die Matrize erneut für 30 sec denaturiert, im zweiten erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer bei der jeweils optimalen Temperatur, im dritten die Polymerasereaktion für 45 sec bei 72 °C. Die abschließende Inkubation für 10 min bei 72 °C sollte sicherstellen, dass die PCR-Produkte vervollständigt wurden, bevor die Reaktion beendet und die Proben schließlich auf 4 °C abgekühlt wurden. Die detaillierten Bedingungen, Primer-Sequenzen und Zyklenzahlen sind unter 3.1.12 aufgelistet. Die Analyse der Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Bei jedem Experiment wurde stets eine GAPDH-Kontrolle durchgeführt, um die gleichbleibende Konzentration der verwendeten cDNA in allen Proben nachzuweisen.

3.2.7 RNA-Interferenz (RNAi)

Die RNA-Interferenz beruht darauf, dass nach endogener Produktion oder künstlicher Einführung von doppelsträngigen, kleinen RNA-Oligonukleotiden (small interfering RNA, siRNA) die mRNA, die zur siRNA-Sequenz komplementär ist, gezielt abgebaut und somit die

Synthese des entsprechenden Proteins verhindert wird (Elbashir et al., 2001; Meister and Tuschl, 2004). Physiologisch dient dieser post-transkriptionelle Mechanismus der Abwehr artfremder Gene, etwa zur Zerstörung des Genoms von RNA-Viren (Ruiz et al., 1998). Die Synthese der gegen die humane NFkB1-, sowie gegen die Luciferase-mRNA gerichteten RNA-Oligonukleotide (siRNA SMART pool) wurde von Dharmacon Inc. (Chicago, USA) vorgenommen. Die Transfektion der siRNAs in HeLa wurde mittels Qiagen HiPerFect™ Transfection Reagent durchgeführt.

Hierzu wurden pro Ansatz 2×10^6 Zellen in 6 ml DMEM-Medium - inklusive 10 % FKS und 1 % Penizillin/Streptomycin - aufgenommen und in eine 10 cm Schale gegeben. Anschließend wurde der Komplex aus siRNA und Transfektions-Reagenz angesetzt, indem 1 ml DMEM - ohne FKS und Antibiotikum -, 75 nM siRNA und 40 μ l HiPerFect™ Reagenz vermischt wurden. Nach 10 min bei RT wurde der Komplex für 24 h auf die Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen 1:4 gesplittet und 24-48 h später RNA und Protein isoliert.

3.2.8 Analyse von Protein/DNA-Komplexen

3.2.8.1 Gel-Retentionsanalyse (EMSA)

Mit Hilfe der Gel-Retardationsanalyse (EMSA, „*electrophoretic mobility shift assay*“) wurde die Interaktion zwischen Proteinen und DNA-Molekülen elektrophoretisch untersucht und charakterisiert. Das Prinzip beruht auf einem Vergleich der elektrophoretischen Mobilität eines proteinfreien DNA-Fragmentes mit der eines DNA/Protein-Komplexes. Die Komplexierung mit einem Protein verlangsamt die Wanderungsgeschwindigkeit (Retardation) eines DNA-Fragmentes im nativen Polyacrylamidgel (PAGE), da der gebildete DNA/Protein-Komplex größer ist als das proteinfreie DNA-Fragment. Unter Verwendung radioaktiv markierter Oligonukleotide wurde das entstehende Bandenmuster durch Autoradiographie nachgewiesen.

3.2.8.1.1 Annealing und Markierung von Oligonukleotiden

Das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren an Promotor-Sequenzen wurde mittels synthetischer dsDNA-Oligonukleotide analysiert. Diese wurden als ssDNA-Oligonukleotide in Sinn- und Gegensinn-Orientierung synthetisiert und durch Hybridisierung zu doppelsträngigen DNA-Fragmenten zusammengefügt. Dafür wurden im PCR-Thermocycler (PTC-200) gleiche Molaritäten komplementärer Stränge in STE-Puffer für 10 min auf 85 °C erhitzt und anschließend mit 1 °C pro min auf RT abgekühlt. Die langsame Temperatur-Reduktion führt dabei zur Anlagerung der komplementären Stränge.

Die dsDNA-Oligonukleotide wurden mit dem radioaktiven Phosphat [32 P] markiert, um sie nach der Gelelektrophorese durch Autoradiographie zu detektieren. Dabei wurde mittels T4-Polynukleotid-Kinase der radioaktive Phosphatrest des [γ - 32 P] ATP auf das nicht-phosphorylierte 5'-Ende der Oligonukleotide übertragen. Hierzu wurden 2 μ g DNA-

Oligonukleotide, 1x T4-Polynukleotid-Kinase Reaktions-Puffer, 40 μCi [γ - ^{32}P] ATP, 10 U T4-Polynukleotid-Kinase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 0,5x Vol. EDTA-haltigem DNA-Ladepuffer.

Nach der Markierung wurden die DNA-Oligonukleotide von überschüssigen, freien [γ - ^{32}P] ATP-Molekülen gereinigt. Die Abtrennung erfolgte dabei in einer nativen 15 %-igen Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 1x TBE-Puffer. Nach der Autoradiographie wurde die entsprechende Bande mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltenen markierten ds Oligonukleotide wurden unter Schütteln bei 4 °C in 500 μl TNE-Puffer eluiert.

3.2.8.1.2 DNA-Bindungsreaktion und Gelelektrophorese

Bei der DNA-Bindungsreaktion wurden zunächst 2 μg Poly(dI-dC), 1x EMSA Bindungs-Puffer, 2 μg Kernextrakt für 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10.000 cpm [^{32}P]-markiertem Oligonukleotid. Nach 30 min bei RT wurde optional für „*Super-Shift*“-Reaktion 2 μg Antikörper zugegeben und 60 min bei 4 °C inkubiert.

Um die Spezifität der Protein/DNA-Interaktion zu demonstrieren wurde die Reaktion mit nichtradioaktiven spezifischen und unspezifischen DNAs komplementiert. Zusätzlich verhindert BSA im Bindungs-Puffer und Poly(dI-dC) unspezifische Protein/DNA-Komplexierungen.

Die Auftrennung der Protein/DNA-Komplexe erfolgte bei 4 °C in einer 5,5 %-igen PAGE mit 0,3x TBE als Laufpuffer für 30 min bei 280 V sowie für eine weitere Stunde bei 350 V. Anschließend wurde das Gel auf 3MM Whatman-Papier für 1 h bei 80 °C getrocknet und die retardierten Komplexe durch Autoradiographie nachgewiesen.

3.2.9 Fluss-Cytometrie-Analyse (FCM)

Bei der Fluss-Cytometrie („*flow-cytometry*“, FCM) wird eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes der einzelnen Zellen kann jede einzelne Zelle in eine der drei verschiedenen Phasen des Zellzyklus, G1-, S-, G2-Phase, eingeordnet werden. Die so genannte „Sub-G1“-Population, deren DNA-Gehalt geringer ist als die der G1 Population, entspricht den apoptotischen Zellen.

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zelle wird diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an DNA und bildet stark-fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Die Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt der Zelle.

3.2.9.1 Prinzip der FCM

Zellen werden in einem feinen Flüssigkeitsstrom durch einen scharf gebündelten Laserstrahl hindurchgeschleust. Der Laser regt die zelluläre Fluoreszenz an, die von einem oder auch mehreren Farbstoffen verursacht wird. Über einen Spiegel- und Filtersystem werden verschiedene Fluoreszenzfarben (blau, grün oder rot) aufgetrennt und separaten Detektoren („*photomultiplier tube*“, PMT) zugeführt. Diese wandeln die Lichtimpulse in elektrische Spannungssignale um, welche von einer elektronischen Pulsanalyse in Größenklassen eingeteilt, gespeichert und als Punktdiagramm der Fluoreszenzintensitäten dargestellt werden.

Neben der Fluoreszenzanregung wird ein Teil des Laserstrahles an den vorbeiströmenden Zellen mehr oder weniger stark gestreut. Zur Messung dieses Streulichtes stehen auch Detektoren zur Verfügung.

3.2.9.2 Zell-Ernte für die FCM

Zunächst wurde das Medium aus der Kulturschale abgenommen und in einen 15 ml Reaktionsbehälter gegeben. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Da beim Waschen sich Zellen ablösen können, wurde das PBS nicht verworfen, sondern ebenfalls in dem gleichen 15 ml Reaktionsbehälter aufgefangen. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, in 4 ml Medium aufgenommen und ebenfalls in den Reaktionsbehälter überführt, in dem sich bereits das ursprüngliche Medium und das PBS mit den Zellen befand. Die Zellen wurden 5 min bei 1500 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 3x mit 5 ml PBS gewaschen und wie oben abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml 70 % Ethanol fixiert. Die Proben wurden bis zur FCM-Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.10 Gewinnung konditionierter Medien/ Makrophagen-Überstände

Auf durch Depletion gewonnene Makrophagen aus einer T-Zell Präparation (durchgeführt von der Abteilung Immungenetik, DKFZ) wurde 20 mL RPMI-Medium inklusive FKS und Antibiotikum gegeben und 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgezogen, erneut frisches RPMI der gleichen Menge zugegeben und wieder 24 h im Brutschrank inkubiert. Um die Zellen, die sich im konditionierten Medium befanden abzutrennen, wurde bei 2000 rpm bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das so gewonnene Medium wird bei -70 °C gelagert.

4. Ergebnisse

4.1 HDAC-Inhibition sensibilisiert HeLa Zellen für die Todesliganden-vermittelte Apoptose

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (HDACs), wie Natriumbutyrat, in der Lage sind, in Zervixkarzinomzellen Wachstumsarrtierung und intrinsische Apoptose zu induzieren. Diese Apoptose wurde durch eine Onkoprotein E7-abhängige pRB Degradation begleitet, die in der Freisetzung von E2F-1 und anschließender Induktion des pro-apoptotischen p53 Homologs p73 resultierte. Zusätzlich konnte eine Beteiligung von Todesrezeptoren bei der HDAC-Inhibitor-induzierten Apoptose vollständig ausgeschlossen werden (Finzer et al., 2004). Unklar blieb jedoch, ob eine zusätzliche Stimulation von Todesrezeptoren durch ihre spezifischen Liganden, die Apoptoserate weiter erhöhen kann.

4.1.1 HDAC-Inhibition erhöht signifikant die CD95- und sensibilisiert für die TNF α -/TRAIL-induzierte Apoptose

Um die Frage zu beantworten inwiefern Natriumbutyrat (NaB) die CD95-induzierte Apoptose in HPV18 positiven HeLa Zellen beeinflusst, wurden diese zunächst mit 6 mM NaB für 19 h vorbehandelt. Anschließend wurde für weitere 5 h der spezifische Ligand des CD95 Rezeptors, CD95L (SuperFasLigand, Alexis Biochemicals), oder der agonistische Antikörper APO-1 (Trauth et al., 1989) zugegeben. Zur Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt oder wurden 24 h mit NaB bzw. 5 h mit dem Ligand alleine behandelt. Zur Verdeutlichung ist in Abb.4.1 das Behandlungsschema dargestellt.

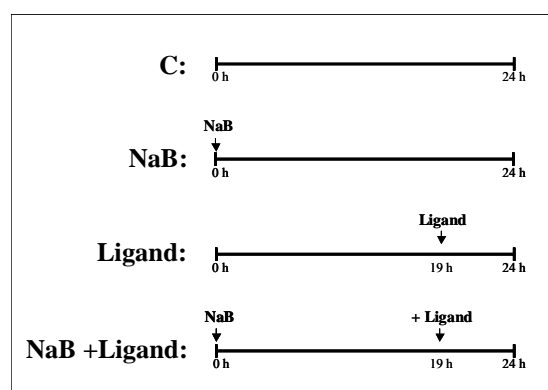


Abb.4.1: Behandlungsschema. Zellen wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (NaB): 24 h 6 mM NaB, (Ligand): 5 h Ligand, (NaB+Ligand): 19 h NaB + 5 h Ligand.

Anschließend wurden die Zellen in 70 %-igem Ethanol fixiert und mittels FCM durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes eine Zellzyklusanalyse durchgeführt, wobei die so

genannte „Sub-G1“-Population den apoptotischen Zellen zugeordnet wurde (siehe auch 3.2.9.2).

Wie in Abb.4.2A zu sehen ist, führte die Behandlung mit NaB zu einer Apoptose-Induktion, die wie bereits publiziert (Finzer et al., 2004) ausschließlich auf dem intrinsischen Weg stattfand. Die Stimulation des CD95 Rezeptors mit seinem spezifischen Liganden (CD95L) sowie mit dem agonistischen Antikörper (APO-1) führte in HeLa ebenfalls zu einer Apoptose-Induktion. Diese Apoptoserate konnte signifikant durch die Vorbehandlung mit NaB erhöht werden.

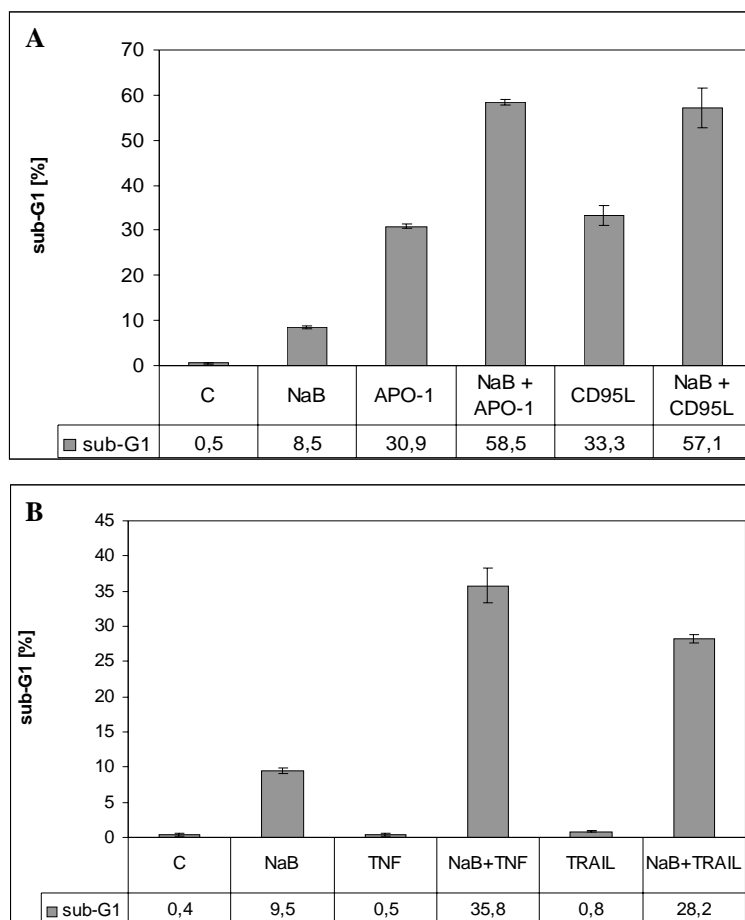


Abb.4.2: HDAC-Inhibition sensibilisiert für die Todesrezeptor-induzierte Apoptose. HeLa Zellen blieben unbehandelt (C), wurden 24 h mit 6 mM Natriumbutyrat (NaB), 5 h mit 100 ng/ml APO-1, 1 µg/ml CD95L, 1 µg/ml TRAIL oder 100 U/ml TNF α behandelt, oder 19 h vorbehandelt mit NaB mit anschließender Zugabe der jeweiligen Liganden für weitere 5 h. Apoptose wurde mittels FCM-Analyse quantifiziert; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Triplets eines Versuches.

HeLa Zellen waren sensibel gegenüber der CD95 vermittelten Apoptose, aber die Stimulation mit TNF α oder TRAIL zeigte keinerlei Effekt, wie in Abb.4.2B zu sehen ist. Wurden die Zellen jedoch, wie bereits für CD95L/APO-1 beschrieben, 19 h mit dem HDAC-Inhibitor vorbehandelt und dann für weitere 5 h mit TNF α oder TRAIL stimuliert, kam es zur

einer starken Apoptose-Induktion. Dies zeigt einen deutlich synergistischen Effekt zwischen dem HDAC-Inhibitor NaB und dem jeweiligen Todesliganden TNF α oder TRAIL.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Inhibition von HDACs die CD95-induzierte Apoptose signifikant erhöhte, während zuvor resistente Zellen für die TNF α /TRAIL-vermittelte Apoptose sensibilisiert wurden.

4.2 Die HDAC-Inhibitor-induzierte c-FLIP-Suppression ist für die Apoptose-Sensibilisierung verantwortlich

Todesrezeptor vermittelte Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden, unter anderem direkt auf der Rezeptorebene (Krueger et al., 2001a). c-FLIP („*FLICE inhibitory protein*“), das in unserem Zellsystem in zwei unterschiedlichen Spleiß-Varianten, „*long*“ (c-FLIP_L) und „*short*“ (c-FLIP_S), existiert, inhibiert die Aktivierung von Caspase 8 direkt am so genannten DISC („*death inducing signaling complex*“) und verhindert dadurch die Todesrezeptor-induzierte Apoptose. Daher ist c-FLIP ein möglicher Angriffspunkt für die Apoptose-Sensibilisierung durch HDAC-Inhibition.

4.2.1 HDAC-Inhibitoren führen zu einer konzentrations- und zeitabhängiger c-FLIP Suppression

Um den Einfluss von HDAC-Inhibition durch NaB auf die c-FLIP-Expression sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA Ebene zu untersuchen, wurden die Zellen wie in Abb.4.1 dargestellt behandelt und anschließend Gesamtzellproteine und RNA isoliert. Wie die Western Blot Analyse in Abb.4.3 A zeigt, führte die ansteigende NaB-Konzentration zur einer steigenden Reduktion beider c-FLIP-Proteine. Da p21 nach HDAC-Hemmung sehr stark induziert wird (Blagosklonny et al., 2002), wurde zur Bestätigung der Wirksamkeit von NaB die p21-Induktion kontrolliert. Die p21-Proteinmenge erhöhte sich, wie erwartet, mit steigender NaB-Konzentration.

Um zu klären, ob diese Reduktion der c-FLIP-Proteine auf Regulationsmechanismen auf der Proteinebene oder auf eine transkriptionelle Suppression zurückzuführen war, wurde die c-FLIP-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Es zeigte sich, dass die mRNA beider c-FLIP-Formen supprimiert wurde (Abb.4.3 B), und zwar abhängig von der NaB-Konzentration.

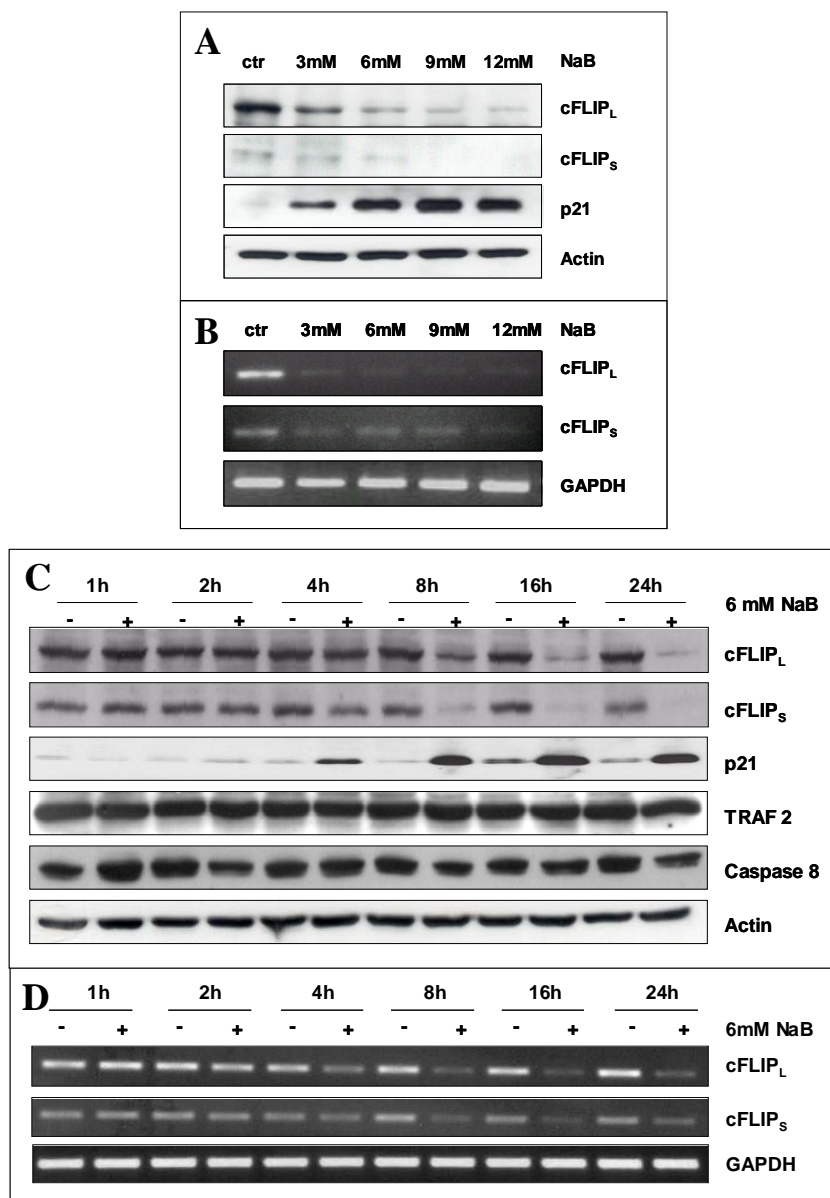


Abb.4.3: HDAC-Inhibition führt zu einer konzentrations- und zeitabhängigen c-FLIP-Suppression. A+B: HeLa Zellen blieben unbehandelt (ctr) oder wurden 24 h mit 3, 6, 9, 12 mM NaB behandelt. C+D: HeLa Zellen blieben unbehandelt (-) oder wurden für 1, 2, 4, 8, 16 und 24 h mit 6 mM NaB (+) behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden für Western Blot Analyse (A+C), RNA-Extrakte für eine semi-quantitative RT-PCR (B+D) verwendet.

Um die Zeitabhängigkeit zu untersuchen, wurden HeLa Zellen 1, 2, 4, 8, 16 und 24 h mit 6 mM NaB behandelt. Anschließend wurden Gesamtproteine und RNA isoliert. Durch die Analyse der Proteine mittels Western Blot (Abb.4.3C) konnte gezeigt werden, dass die Abnahme von c-FLIP_L bei 8 h begann, wobei diese im Fall von c-FLIP_S bereits nach 4 h erkennbar wurde. Andere Komponenten des DISC, TRAF 2 und Caspase 8 blieben durch die HDAC-Inhibition unverändert. Wie im vorangegangenen Experiment wurde auch hier das p21-Protein als Indikator für HDAC-Inhibition herangezogen, das mit steigender Behandlungsdauer deutlich zunahm. Bei der Untersuchung der c-FLIP-mRNAs mittels RT-

PCR (Abb.4.2D) konnte gezeigt werden, dass die Suppression beider Spleiß-Varianten nach 4 h Inkubation mit NaB einsetzte.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die c-FLIP-Expression nach Behandlung mit NaB konzentrations- und zeitabhängig bereits auf mRNA-Ebene supprimiert wurde.

4.2.2 Stabile Expression von c-FLIP verhindert die Apoptose-Sensibilisierung

Mit Hilfe der vorangegangenen Experimente konnte festgestellt werden, dass die anti-apoptotischen Proteine c-FLIP_L und c-FLIP_S durch HDAC-Inhibition supprimiert wurden. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Suppression kausal für die NaB-induzierte Apoptose-Sensibilisierung verantwortlich ist. Dies wurde mit Hilfe von HeLa Klonen untersucht, die jeweils die eine der beiden Spleiß-Varianten von c-FLIP stabil exprimieren.

4.2.2.1 Starke Reduktion der Apoptose-Sensibilisierung durch stabile c-FLIP_S-Expression

Um die Rolle von c-FLIP_S in der Apoptose-Sensibilisierung genauer zu untersuchen, wurden c-FLIP_S-FLAG exprimierende stabile HeLa Klone (Krueger et al., 2001b) verwendet. Hierfür wurden die Zellen, wie im Behandlungsschema in Abb.4.1 dargestellt behandelt. Anschließend wurde Gesamtprotein extrahiert. Mittels Western Blot wurde die c-FLIP_S-Expression des Klones bzw. des entsprechenden Kontroll-Klones, der lediglich mit dem Expressionsplasmid ohne Insert transfiziert wurde, untersucht. Das ektopische c-FLIP_S-Protein konnte vom endogenen Protein leicht unterschieden werden, da es aufgrund seines FLAG-Anhangs eine langsamere Wandergeschwindigkeit im Acrylamidgel aufwies. In Abb.5.4 A ist zu erkennen, dass das endogene Protein durch NaB-Behandlung nicht mehr nachweisbar war, während die Expression des ektopischen Proteins sogar anstieg. Dies liegt am verwendeten CMV-Promotor, der durch HDAC-Inhibition induziert wird (Choi et al., 2005). Das endogene c-FLIP_L-Protein in den Klonen wies keinerlei Unterschied zu normalen HeLa auf und wurde unter HDAC-Inhibition reduziert.

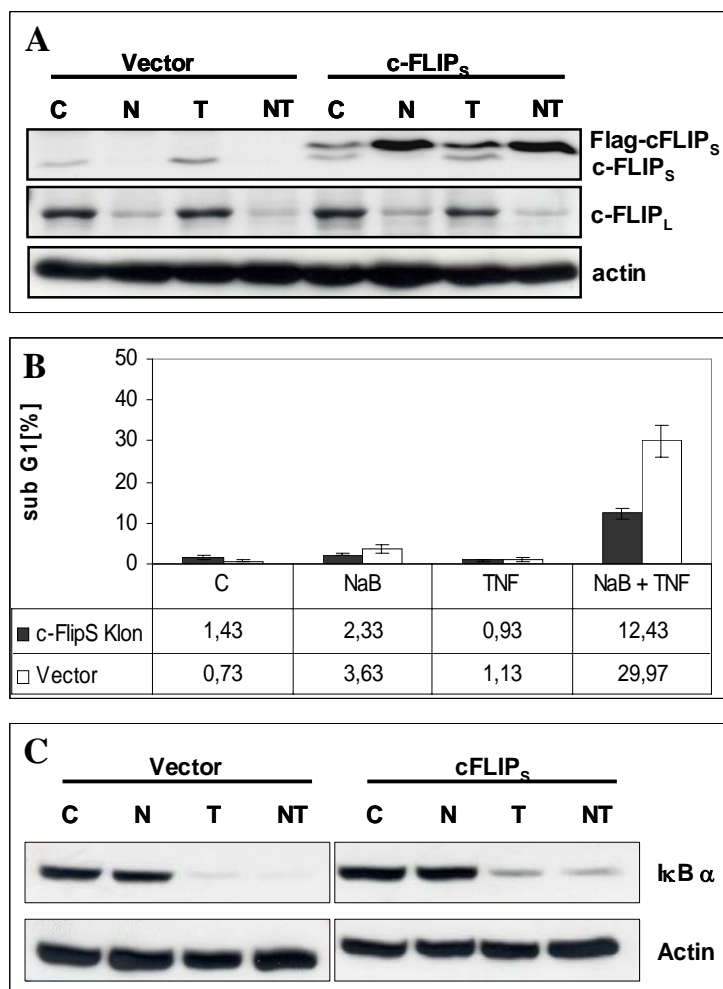


Abb.4.4: Stabile Expression von c-FLIP_s führt zu einer starken Reduktion der Apoptose-Sensibilisierung. (A+B): c-FLIP_s-Klon bzw. der entsprechende Kontroll-Klon wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . **A:** Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte. **B:** Apoptose-Quantifizierung mittels FCM-Analyse quantifiziert; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Tripletts eines Versuches. **C:** Zellen wurden behandelt wie für A+B beschrieben, wobei die TNF α -Stimulation auf 30 min reduziert wurde. Cytoplasmatische Proteinextrakte wurden im Western Blot untersucht.

Bei der Quantifizierung der Apoptose (Abb.4.4B), konnte zwischen beiden Zelllinien nahezu kein Unterschied zwischen der NaB-Behandlung (3,6 vs. 2,3 %) und der TNF α -Behandlung (1,1 vs. 0,9 %) festgestellt werden. Bei der kombinierten Behandlung von NaB und TNF α allerdings ist deutlich zu erkennen, dass der c-FLIP_s Klon, verglichen mit dem Kontroll-Klon, um nahezu zwei Drittel (12 vs. 30 %) weniger Apoptose aufwies. Dies zeigt, dass die stabile Expression von c-FLIP_s in der Lage war, die Sensibilisierung stark zu inhibieren.

I κ B α wird sehr schnell nach TNF α -Stimulation degradiert (Zandi and Karin, 1999) und kann daher als Indikator für den funktionierenden TNF α -Signalweg dienen. Um auszuschließen, dass die Blockierung der Sensibilisierung auf Störungen im TNF α -Signalweg beruht, wurde die I κ B α -Degradation untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie in Abb.4.1 dargestellt behandelt, mit dem Unterschied, dass die TNF α -Behandlung von 5 h auf 30 min reduziert wurde. Diese Reduktion ist notwendig, da die Expression von I κ B α selbst durch TNF α stimuliert wird und zu einem späteren Zeitpunkt keine Unterschiede in den I κ B α Proteinmengen festzustellen sind.

Nach der Behandlung wurden Cytoplasmaproteine extrahiert und durch Western Blot analysiert. Sowohl in dem Kontroll-Klon, als auch im c-FLIP_S-Klon konnte eine I κ B α -Degradation nachgewiesen werden, wie in Abb.4.4C zu sehen ist. Damit wurde die Möglichkeit einer gestörten Signaltransduktion nach TNF α -Stimulation ausgeschlossen.

4.2.2.2 Vollständige Hemmung der Apoptose-Sensibilisierung durch stabile c-FLIP_L-Expression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass c-FLIP_S für die TNF α -vermittelte Apoptose nach HDAC-Hemmung eine wichtige Rolle spielt, wurde der Einfluss von c-FLIP_L auf die Sensibilisierung untersucht.

Hierzu wurden zunächst HeLa entweder mit dem pEFrsFLAG A/B/C c-FLIP_L Plasmid (Scaffidi et al., 1997) bzw. dem Leervektor transfiziert. Nach einigen Tagen Selektion konnte klonales Wachstum beobachtet werden (siehe Abb.4.5).

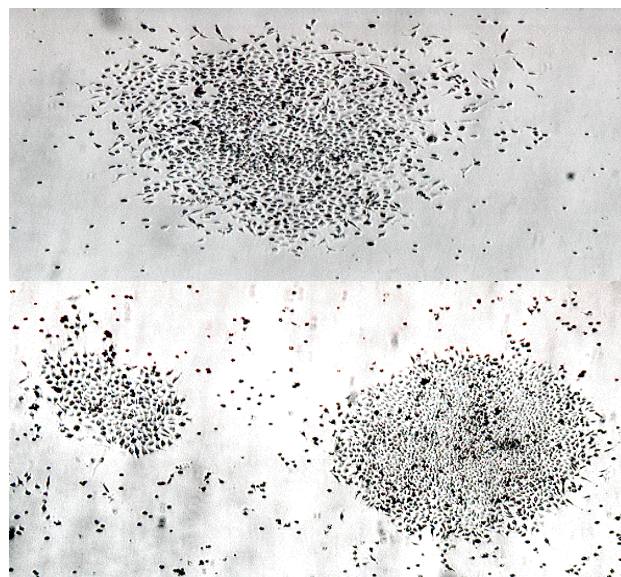


Abb.4.5: Klonales Wachstum transfizierter HeLa während der Selektion. HeLa transfiziert mit pEFrsFLAG A/B/C c-FLIP_L nach 4 Tagen Selektion mit 1 μ g/ μ l Puromycin; aufgenommen mit Kodak T-Max 400 bei 250x Vergrößerung.

Nach der Isolierung von verschiedenen Klonen wurden ein Kontroll-Klon, transfiziert mit dem Leervektor, und zwei c-FLIP_L-Klone, die das c-FLIP_L-FLAG-Protein in unterschiedlichen Mengen stabil exprimieren für die Untersuchungen ausgewählt.

Der Western Blot nach NaB/TNF α -Behandlung diente zur Analyse der c-FLIP_L-Expression der verschiedenen Klone. Auch hier konnte das ektoische vom endogenen Protein aufgrund seines FLAG-Restes leicht unterschieden werden. Wie in Abb.4.6A dargestellt, wurde die Menge des endogenen Proteins durch NaB-Behandlung reduziert, wohingegen das c-FLIP_L-FLAG unter gleichen Bedingungen vollkommen unverändert blieb, da dessen Expression, im Gegensatz zu dem c-FLIP_S-FLAG, unter der Kontrolle eines HDAC-insensitiven Promotors stand.

Auch hier wies das endogene c-FLIP_S-Protein in den Klonen keinerlei Unterschied zu normalen HeLa Zellen auf und wurde unter HDAC-Inhibition runterreguliert.

Die Apoptose-Quantifizierung zeigte, dass die stabile Expression von c-FLIP_L imstande ist, die TNF α -vermittelte Apoptose nach HDAC-Inhibition komplett zu verhindern. Wie die Abb.4.6B zeigt, wurde der Anteil der Apoptose nach NaB/TNF α -Behandlung bei beiden Klonen auf das Niveau der nur mit NaB-behandelten Zellen reduziert, während der Kontroll-Klon bei gleichen Bedingungen eine 7-fach höhere Apoptoserate aufwies. Dies demonstrierte deutlich, dass die stabile Expression von c-FLIP_L in der Lage war, die Sensibilisierung vollständig zu verhindern und somit eine bedeutendere Rolle spielte als c-FLIP_S.

Auch hier wurde der TNF α -Signalweg mittels I κ B α -Degradation untersucht. Zellen wurden wie bereits für c-FLIP_S-FLAG beschrieben analysiert. Wie im Western Blot in Abb.4.6C zu sehen ist, konnte in allen Klonen eine I κ B α -Degradation nachgewiesen werden. Daraus konnte auch hier gefolgert werden, dass die Blockierung der Apoptose-Sensibilisierung nicht auf Störungen im TNF α -Signalweg beruht.

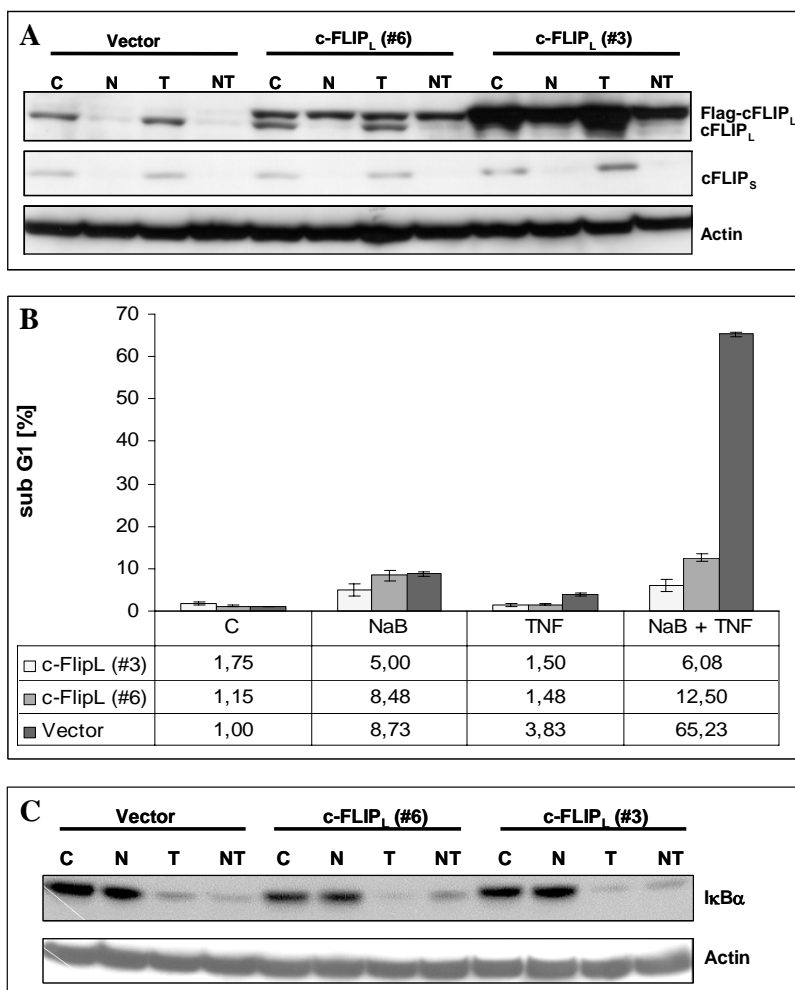


Abb.4.6: Stabile c-FLIP_L-Expression verhindert die Apoptose-Sensibilisierung vollständig. (A+B): c-FLIP_L-Klone bzw. der entsprechende Kontroll-Klon wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . **A:** Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte. **B:** Apoptose-Quantifizierung mittels FCM-Analyse; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Triplets eines Versuches. **C:** Zellen wurden behandelt wie für A+B beschrieben, wobei die TNF α -Stimulation auf 30 min reduziert wurde. Cytoplasmatische Proteinextrakte wurden im Western Blot untersucht.

Mit diesen Experimenten konnte eindeutig demonstriert werden, dass die NaB-induzierte c-FLIP-Suppression ursächlich für die Sensibilisierung gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose verantwortlich ist. Zusätzlich wurde festgestellt, dass c-FLIP_L für die Sensibilisierung der Zellen eine wichtigere Rolle zu spielen schien als c-FLIP_S, denn obwohl die stabile Expression von c-FLIP_S signifikant die Apoptose-Induktion reduzieren konnte, war nur c-FLIP_L in der Lage, diese vollständig zu verhindern.

4.3 NaB-induzierte Hemmung der NF- κ B DNA-Bindung ist nicht die Ursache der c-FLIP-Suppression

In verschiedenen Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B für die pro-apoptotische Wirkung von HDAC-Inhibitoren (Takada et al., 2006) verantwortlich ist. Zusätzlich ist bekannt, dass NF- κ B eine essentielle Rolle in der transkriptionellen Aktivierung von c-FLIP spielt (Kumar et al., 2004). Dies führte zu der Frage, ob HDAC-Hemmung auch im hier verwendeten System einen Einfluss auf NF- κ B hat und wenn ja, ob dies die Ursache der c-FLIP Suppression darstellt.

4.3.1 HDAC Inhibition hemmt die konstitutive und induzierbare NF- κ B DNA-Bindungsaktivität

Um den Einfluss von NaB auf die NF- κ B DNA-Bindungsaktivität zu untersuchen wurden Kernproteine nach NaB/TNF α Behandlung isoliert und für EMSA Analysen verwendet. Die Abb.4.7 dokumentiert die Interaktion der Kernproteine mit der NF- κ B Konsensus-Sequenz, wobei die obere Bande den p50/p65 Heterodimeren, die untere den p50/p50 Homodimeren entsprach. Deutlich zu erkennen war das komplette Verschwinden der p50/p50 Homodimere und die signifikante Reduktion der p50/p65 Heterodimere nach NaB Behandlung. Dies zeigt, dass die HDAC Inhibition durch NaB die konstitutive NF- κ B DNA-Bindungsaktivität signifikant hemmte.

Die Stimulation mit TNF α induzierte eine erhöhte NF- κ B DNA-Bindungsaktivität, die allerdings durch NaB-Behandlung wesentlich vermindert werden konnte. Um die Spezifität dieses Einflusses zu zeigen, wurde ebenfalls die Interaktion der Kernproteine mit der Oct-1 Konsensus-Sequenz dargestellt, die aber bei allen Versuchsbedingungen unverändert blieb.

Neueste Untersuchungen (Li et al., 2007) haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 ebenfalls eine negativ regulatorische Rolle in der c-FLIP-Expression hat. Die Bindung von c-Fos/c-Jun-Heterodimeren an den Promotor wirkt repressiv auf die c-FLIP_L-Expression. Daher stellte sich die Frage, ob NaB über AP-1 zu einer transkriptionellen Repression von c-FLIP führte. Die EMSA-Analyse (Abb.4.7) mit Oligonukleotiden, die die AP-1-Konsensus-Sequenz enthielten, ergab jedoch keine verstärkte AP-1 DNA-Bindung nach NaB-Behandlung. Im Gegenteil führte NaB zu einer leichten Hemmung von AP-1, während TNF α -vermittelte AP-1-Aktivierung überhaupt nicht beeinträchtigt wurde.

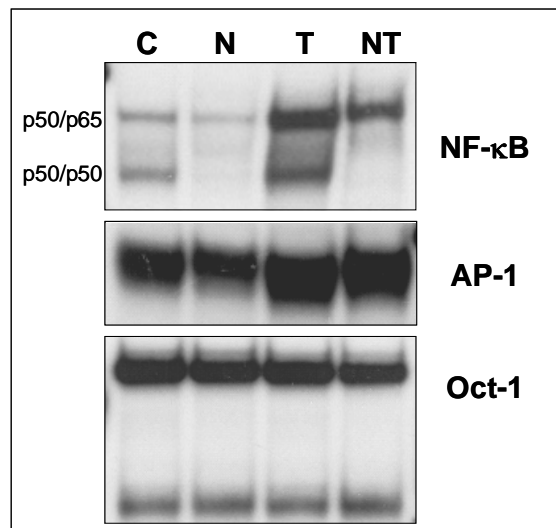


Abb.4.7: HDAC-Inhibition hemmt die konstitutive und induzierbare NF- κ B DNA-Bindungsaktivität. HeLa Zellen wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . Kernextrakte wurden für EMSA Analysen mit Konsensus-Sequenz-Oligonuklotiden, verwendet.

4.3.2 HDAC-Inhibition führt zur Suppression von NFKB1 (p50) während p65 unbeeinflusst bleibt

Das NFKB1 Gen, das für das Vorläuferprotein p105 von p50 kodiert, ist durch die Anwesenheit von κ B-Bindungsstellen in seinem Promotor autoreguliert, und wird durch NF- κ B aktiviert (May and Ghosh, 1997; Brasier et al., 2001). Da gezeigt werden konnte, dass durch HDAC-Inhibition p50/p50-Homodimere vollständig verschwunden und p50/p65-Heterodimere signifikant reduziert wurden, stellte sich die Frage, ob diese NF- κ B-Hemmung auch eine funktionelle Rolle in der transkriptionellen Autoregulation hat und zu einer Rückkopplungs-Repression von NFKB1 führt. Zu diesem Zweck wurde eine Kinetik der NaB-Wirkung auf HeLa Zellen durchgeführt. Anschließend wurden Gesamtproteine und RNA isoliert. Durch Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass die p50-Mengen durch die HDAC-Hemmung mit vergleichbarer Kinetik wie c-FLIP reduziert waren (Abb.4.8 A), während die Menge an p65 vollkommen unverändert blieb.

Die Analyse der mRNA mittels RT-PCR ergab ein ähnliches Bild. p50 wurde bereits auf Transkriptionsebene supprimiert, wobei auch hier p65 unbeeinträchtigt blieb (Abb.4.8 B).

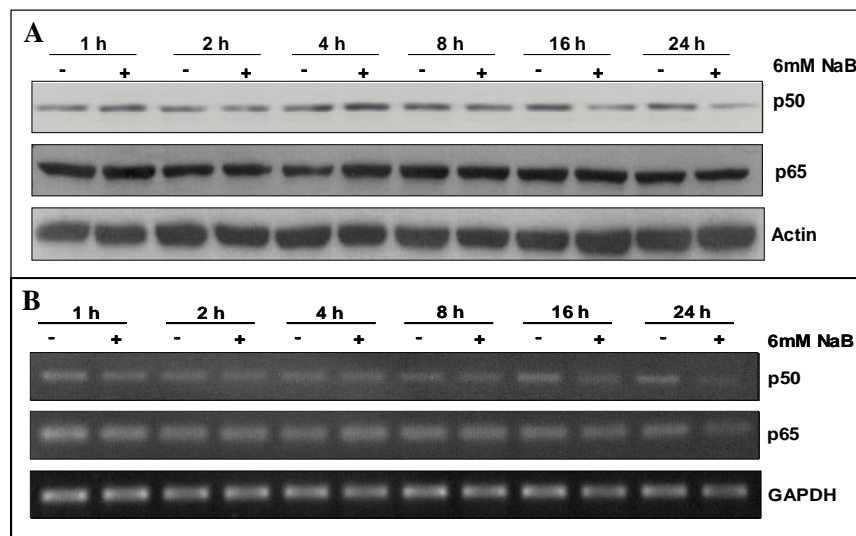


Abb.4.8: HDAC-Inhibition führt zu einer p50-Suppression. HeLa Zellen blieben unbehandelt (-) oder wurden für 1, 2, 4, 8, 16 und 24 h mit 6 mM NaB (+) behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden für Western Blot Analyse (A), RNA-Extrakte für semiquantitative RT-PCR (B) verwendet.

4.3.3 HDAC-Inhibition hat keinen Einfluss auf die Translokation der NF- κ B-Proteine in den Nukleus

Obwohl gezeigt werden konnte, dass p65-Mengen durch NaB-Behandlung unbeeinflusst blieben, könnte, durch HDAC-Hemmung dennoch die p65-Translokation in den Zellkern verhindert werden. Dies wurde bereits von Krämer et al. gezeigt (Kramer et al., 2006). Um einen möglichen Einfluss von NaB auf die NF- κ B p65-Translokation zu untersuchen wurden die Zellen nach dem Behandlungsschema in Abb.4.1 behandelt. Anschließend wurde eine getrennte Isolierung von Kern- und Cytoplasmaproteinen durchgeführt, die mittels Western Blot analysiert wurden. Die Qualität der Trennung wurde mit Hilfe des cytoplasmatischen Markers Pyruvatkinase Typ M2 (PK M2) und des Transkriptionsfaktors SP-1 nachgewiesen, der als Kern-Marker diente. Wie in Abb.4.9 zu sehen ist, waren beide Proteine ausschließlich jeweils im Cytoplasma bzw. im Kern nachweisbar. Im Falle von NF κ B1 konnte nochmals bestätigt werden, dass HDAC-Hemmung zur Reduktion von p50 und dessen Vorläuferprotein p105 führte. NF- κ B-Stimulation durch TNF α -Behandlung führte zu einem Anstieg der p105-Proteinmenge im Cytoplasma. Die p50-Mengen hingegen waren sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern erhöht. Dieser Erhöhung konnte die zusätzliche Behandlung mit NaB entgegenwirken, wie bereits gezeigt wurde. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Krämer et al. (Kramer et al., 2006) konnte hier kein Einfluss der HDAC-Inhibition auf die p65-Translokation in den Kern beobachtet werden. Auch die TNF α -stimulierte Erhöhung der Translokation blieb durch HDAC-Hemmung vollkommen unbeeinträchtigt. Somit ist p50 das einzige NF- κ B-Protein das durch die HDAC-Hemmung beeinflusst wird.

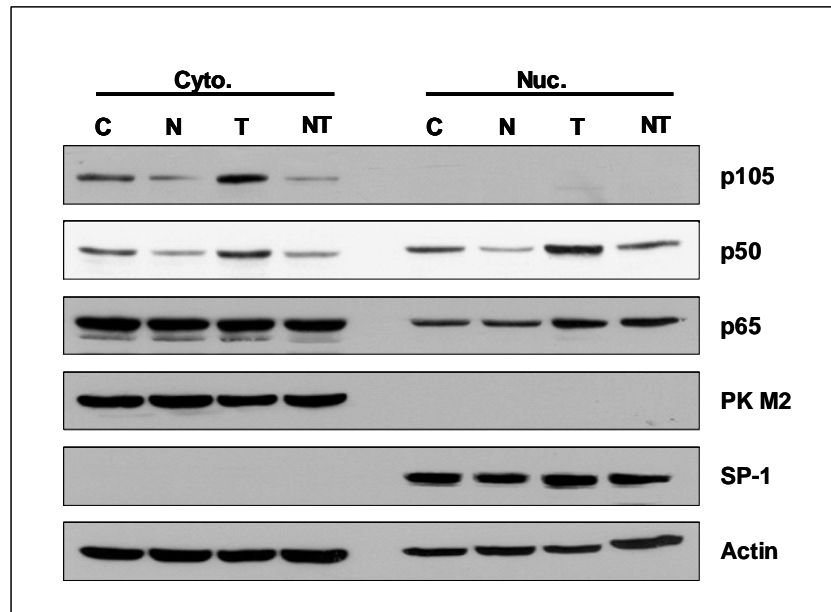


Abb.4.9: HDAC-Inhibition zeigt keinen Einfluss auf die p65-Translokation in den Kern. HeLa Zellen wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . Kern- und Cytoplasmaproteinextrakte wurden diese mittels Western Blot untersucht.

4.3.4 HDAC-Inhibition verursacht eine Reduktion von Bcl-3 auf Proteinebene

Die HDAC-Inhibitor-induzierte NF- κ B-Hemmung konnte auf p50 zurückgeführt werden, da dies das einzige NF- κ B-Molekül war, das durch NaB beeinflusst wurde. p50-Moleküle selbst besitzen allerdings keine Transaktivierungsdomäne und wirken daher als p50/p50-Homodimere stets als transkriptionelle Repressoren (Franzoso et al., 1992). Bcl-3 jedoch, ein Protein der I κ B Familie, kann sich an p50 oder p50/p50-Homodimere anlagern und so transaktivierend wirken (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993). Zusätzlich wird der N-Terminus von Bcl-3 für die effektive p50-Translokation in den Kern benötigt (Zhang et al., 1994).

Aufgrund dieser Eigenschaften von Bcl-3, stellte sich die Frage, ob dieses Protein ebenfalls durch die HDAC -nhibition beeinträchtigt wird.

Bei der Western Blot Analyse stellte sich heraus, dass die Behandlung mit NaB zu einer Verringerung des Bcl-3-Proteins führte (Abb.4.10 A). Nach TNF α -Stimulation konnte ein sehr leichter Anstieg der Bcl-3-Menge beobachtet werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass Bcl-3 selbst NF- κ B reguliert ist und nach TNF α -Stimulation induziert werden kann (Ge et al., 2003). Die kombinierte NaB/TNF α -Behandlung führte ebenfalls zu einer Reduktion der Bcl-3-Proteinmenge, die allerdings nicht so ausgeprägt war, wie bei der alleinigen Behandlung mit NaB.

Die Bcl-3-mRNA wurde durch NaB nicht supprimiert, wie in der Northern Blot Analyse in Abb.4.10B zu sehen ist. Daher ließ sich die Bcl-3-Reduktion auf Ereignisse zurückführen, die auf Proteinebene stattfanden.

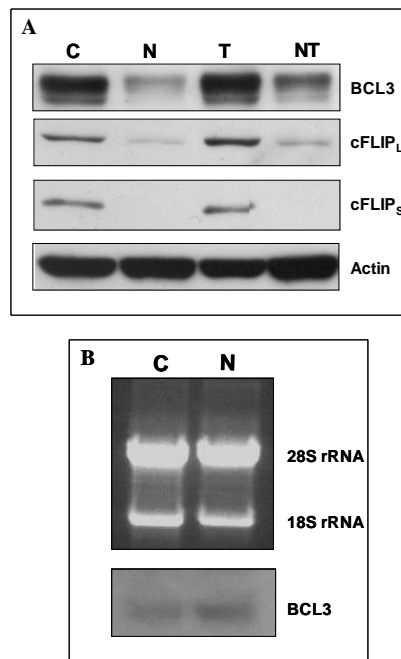


Abb.4.10: HDAC-Inhibition führt zu Bcl-3-Protein-Reduktion. HeLa Zellen wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . **A:** Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte. **B:** RNA Gel mit anschließender Northern Blot Analyse, wobei Bcl-3-DNA als Hybridisierungs-sonde verwendet wurde.

4.3.5 Bcl-3 hat keinen Einfluss auf die c-FLIP-Suppression

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibition zu verringerten Bcl-3-Proteinmengen führt. Daraus ergab sich die Frage, welche Bedeutung dieses Ereignis für die Suppression von c-FLIP hat. Um dies zu beantworten, wurde ein Modellsystem ausgewählt, das auf HeLa und primären humanen Lungen-Fibroblasten (IMR-90) beruht. Aus diesen beiden parental Zellen wurden durch somatische Fusion HeLa-Fibroblasten-Hybride (444) generiert, die bei Transplantation in immunsupprimierte Mäuse einen nicht-tumorigenen Phänotyp aufweisen (Stanbridge, 1988). Die 444 Hybride erweisen sich als genetisch instabil und das Passagieren konfluenter Kulturen *in vitro* führt langfristig zur Segregation einzelner Klone mit tumorigenem Phänotyp (CGL3) (Stanbridge, 1988).

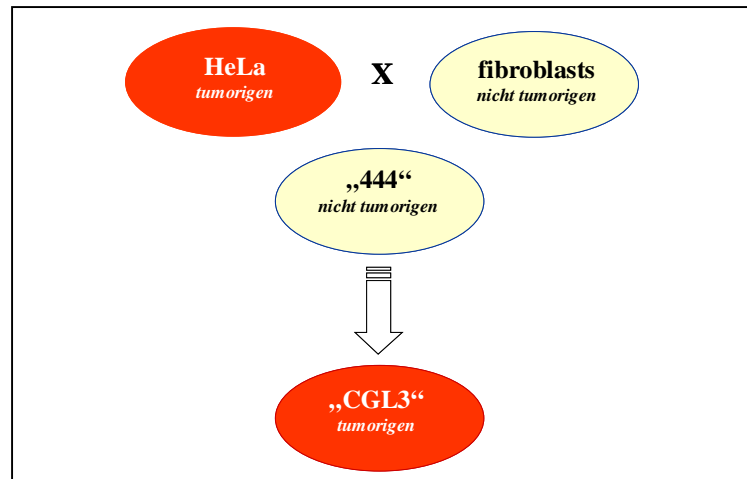


Abb.4.11: Modellsystem aus tumorigenen und nicht-tumorigenen Zelllinien. Aus der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und humanen Fibroblasten (IMR-90) wurden nicht-tumorigene HeLa-Fibroblasten-Hybride (444) generiert. Deren Segregation führt zu Hybridklonen mit tumorigenem Phänotyp (CGL3), (Stanbridge, 1988).

Der für diese Untersuchung wichtige Unterschied zwischen beiden Zelllinien liegt in der Expression von Bcl-3. Wie in der Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte in Abb.4.12 A zu sehen ist, exprimierten 444 im Gegensatz zu HeLa und CGL3 im unbehandelten Zustand nur residualen Mengen an Bcl-3. Allerdings konnte die Bcl-3 Expression in 444 durch 5-stündige TNF α -Stimulation stark induziert werden. NaB-Vorbehandlung verhinderte jedoch diese durch TNF α -vermittelte Induktion vollständig.

CGL3 Zellen wiesen im unbehandelten Zustand eine niedrigere Bcl-3-Menge auf, die sich ebenfalls durch 5-stündige TNF α -Stimulation weiter induzieren ließ. Im Gegensatz zu 444 Zellen, konnte hier die Vorbehandlung mit NaB die Bcl-3-Induktion durch TNF α lediglich sehr leicht hemmen.

Betrachtet man nun die c-FLIP-Proteinmengen, so wurden diese in allen drei Zelllinien in Anwesenheit von NaB, sowohl mit, als auch ohne zusätzliche TNF α -Stimulation, ähnlich stark verringert. Unter diesen Bedingungen unterschieden sich die Bcl-3-Mengen in den unterschiedlichen Zelllinien stark voneinander und es ließ sich keine Korrelation zwischen verringerten Bcl-3-Proteinmengen und verringerten c-FLIP-Mengen feststellen. Am deutlichsten ist dies in CGL3 Zellen zu erkennen: bei NaB/TNF α -Behandlung waren beide c-FLIP-Isoformen mit gleicher Intensität verringert, wie in den anderen Zelllinien, trotz der im Vergleich hohen Bcl-3-Mengen. Aus diesem Grund ließ sich eine NaB-vermittelte Reduktion von Bcl-3 als kausales Ereignis für die c-FLIP-Reduktion ausschließen.

In der Apoptose-Sensibilisierung konnte zwischen den drei Zelllinien kein Unterschied beobachtet werden (Abb.4.12 B).

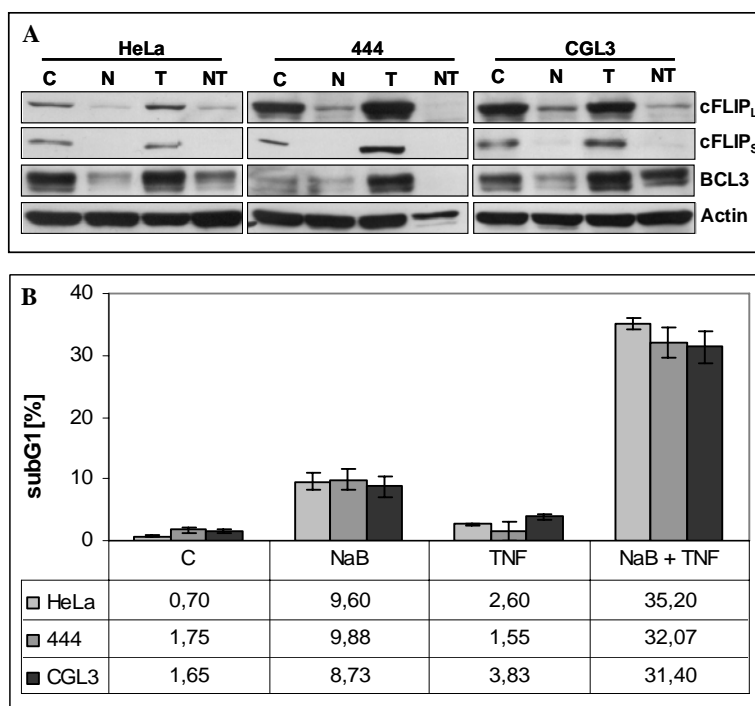


Abb.4.12: Unterschiedliche Bcl-3Expression hat keinen Einfluss auf die c-FLIP-Reduktion und die Apoptose-Sensibilisierung. HeLa, 444 und CGL3 wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . **A:** Proteinextrakte wurden für Western Blot Analyse verwendet. **B:** Apoptose wurde mittels FCM-Analyse quantifiziert; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Triplets eines Versuches.

4.3.6 siRNA gegen NFKB1 (p50) hat keinen Einfluss auf c-FLIP-Expression

p50 wurde als die NF- κ B-Untereinheit identifiziert, die für die NaB-vermittelte Hemmung der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität verantwortlich ist. Nun stellte sich die Frage, inwiefern p50 in die c-FLIP-Suppression nach HDAC-Hemmung involviert ist.

Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde entweder siRNA gegen NFKB1 (p50) oder Kontroll-siRNA gegen Luciferase in HeLa Zellen transient transfiziert und nach 48 bzw. 72 h Protein und RNA extrahiert.

Wie in Abb.4.13A zu sehen ist, war das p105-Protein bereits 48 h nach Transfektion mit NFKB1-siRNA vollständig verschwunden, während p50 selbst auch nach 72 h lediglich leicht reduziert war. Dies kann auf die längere Halbwertszeit von p50 im Vergleich zu p105 zurückgeführt werden (Cressman and Taub, 1994). Die Reduktion hatte allerdings keinerlei Einfluss auf die c-FLIP-Expression, weder auf Protein noch auf mRNA Ebene (Abb.4.13 B). Obwohl auf Proteinebene der Effekt der NFKB1-siRNA deutlich zu erkennen war, konnte auf RNA-Ebene nur eine leichte Reduktion der mRNA nachgewiesen werden. Dies könnte daran

liegen, dass bei RNA-Interferenz die RNA nicht immer zwangsläufig abgebaut, sondern lediglich die Translation verhindert wird (Meister and Tuschl, 2004).

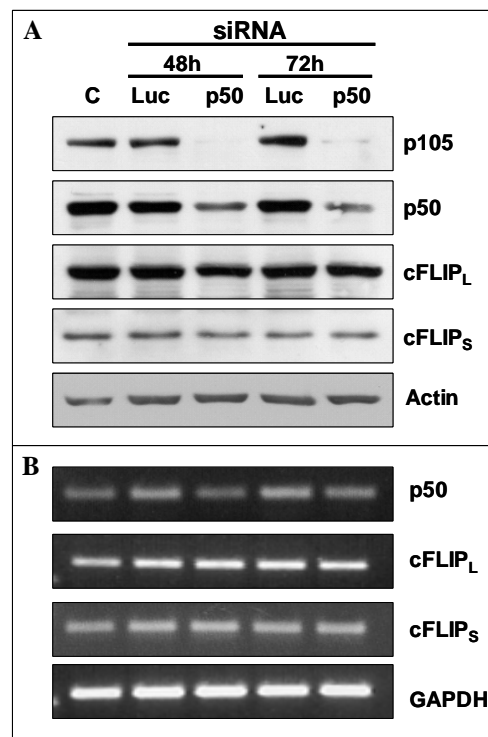


Abb.4.13: NFKB1-siRNA zeigt keinen Einfluss auf die c-FLIP-Expression. HeLa Zellen wurden transfiziert mit NFKB1 SMART pool™ siRNA (p50) oder Kontroll siRNA gegen Luciferase (Luc). 48 bzw. 72 h nach Transfektion wurde RNA und Protein extrahiert und im Western Blot (A) oder durch semiquantitative RT-PCR (B) untersucht.

4.3.7 NaB induziert eine c-FLIP-Suppression auch in NFKB1-defizienten HeLa

Im vorangegangenen Experiment hatte die Ausschaltung der NFKB1-Translation durch siRNA keinen Einfluss auf die c-FLIP-Expression. Da aber gleichzeitig nur eine leichte Reduktion der p50-Proteinmenge stattfand, konnte mit diesem Experiment eine Beteiligung von p50 an der NaB-vermittelten c-FLIP-Suppression nicht ausgeschlossen werden. Um dieser Frage genauer auf den Grund zu gehen, wurde ein NFKB1-defizienter HeLa Klon (HeLa p50-) untersucht.

Reduzierte p50-Mengen in diesem Klon hatten keinen Effekt auf c-FLIP-Mengen, weder im unbehandelten Zustand, noch bei der NaB-vermittelten c-FLIP-Reduktion auf Protein (Abb.4.14 A) oder -Suppression auf transkriptioneller Ebene (Abb.4.14 B). Diese Ergebnisse deuteten auf eine geringe Rolle von p50 auf die c-FLIP-Expression hin. Allerdings

war p50 im HeLa p50- Klon zwar deutlich reduziert, aber nicht vollständig abwesend, und konnte durch Stimulation mit TNF α erneut induziert werden (Abb.4.14A). Daher ließ sich eine Beteiligung an p50 an der Expression von c-FLIP nicht zweifelsfrei ausschließen.

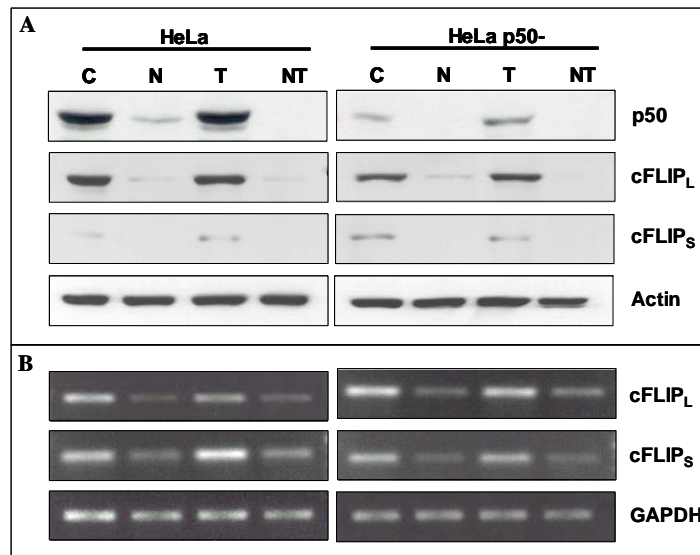


Abb.4.14: Kein Unterschied in der HDAC-Inhibitor induzier-ten c-FLIP-Suppression zwischen HeLa und HeLa p50-. HeLa und HeLa p50- wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . Gesamtproteinextrakte wurden für Western Blot Analyse (A), RNA-Extrakte für semiquantitative RT-PCR (B) verwendet.

4.3.8 HDAC-Inhibitor-induzierte c-FLIP-Suppression ist unabhängig von NF- κ B p50

Um weiter nachzuweisen, dass p50 bzw. NF- κ B, entgegen Berichten aus der Literatur (Kumar et al., 2004), keinen Einfluss auf die c-FLIP-Expression hat, wurde der folgende Versuch durchgeführt: HeLa Zellen wurden 24 h mit NaB behandelt, anschließend wurde NaB entfernt und für weitere 24 h frisches Medium zugegeben (24h N+/24h N-). In Abb.4.15 ist das Behandlungsschema dargestellt.

Die Western Blot Analyse in Abb.4.15 demonstriert, dass 24 h nach Entfernen von NaB c-FLIP-Mengen wieder fast vollständig angestiegen waren. Dies zeigt, dass die NaB-vermittelte c-FLIP-Reduktion reversibel ist. Bei gleichen Bedingungen allerdings waren p105 und p50 noch immer im gleichen Umfang wie unmittelbar nach NaB-Behandlung reduziert. Daraus ließ sich schließen, dass die Anwesenheit von p50 für die c-FLIP-Expression nicht essentiell sein kann.

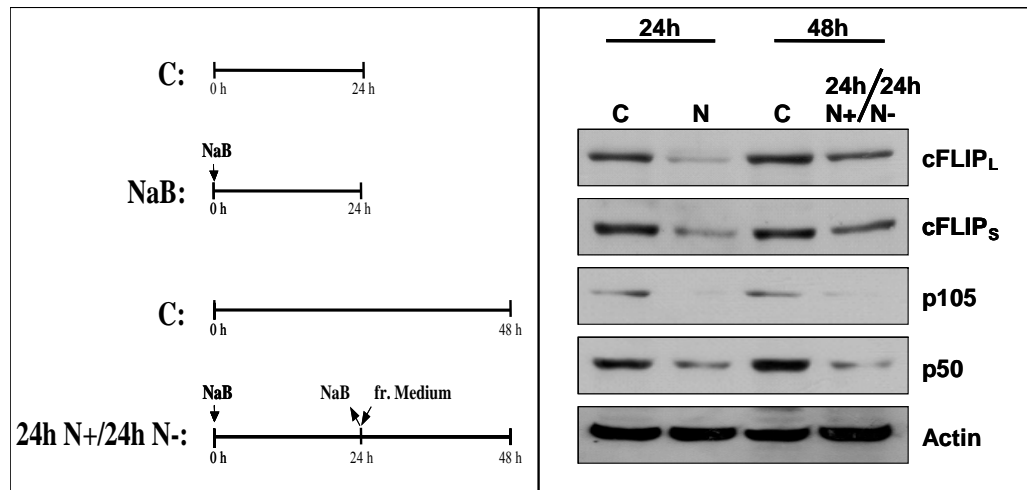


Abb.4.15: HDAC-Inhibitor-induzierte c-FLIP-Suppression ist unabhängig von NF- κ B p50. HeLa Zellen wurden wie im Behandlungsschema dargestellt behandelt: 24 h NaB (N), unbehandelt (C), 24 h NaB, anschließend wurde das NaB entfernt und für weitere 24 h frisches Medium auf die Zellen gegeben (24 h N+/24 h N-). Gesamtproteinextrakte wurden im Western Blot untersucht.

4.4 HDAC-Inhibition induziert keinen c-FLIP-Repressor

NF- κ B-Inhibition als Ursache für die c-FLIP-Suppression nach NaB-Behandlung konnte ausgeschlossen werden. Die Hemmung der HDAC-Aktivität wandelt Heterochromatin in Euchromatin um und führt somit häufig zur Induktion von Genen. Nun stellte sich die Frage, ob NaB eventuell die Induktion eines transkriptionellen Repressors hervorruft, der die c-FLIP-Suppression verursacht. Um diese Frage zu beantworten, wurde in den letzten 0,5 bis 4 h der 24-stündigen NaB-Behandlung die *de novo* Synthese durch Cycloheximid (CHX) inhibiert.

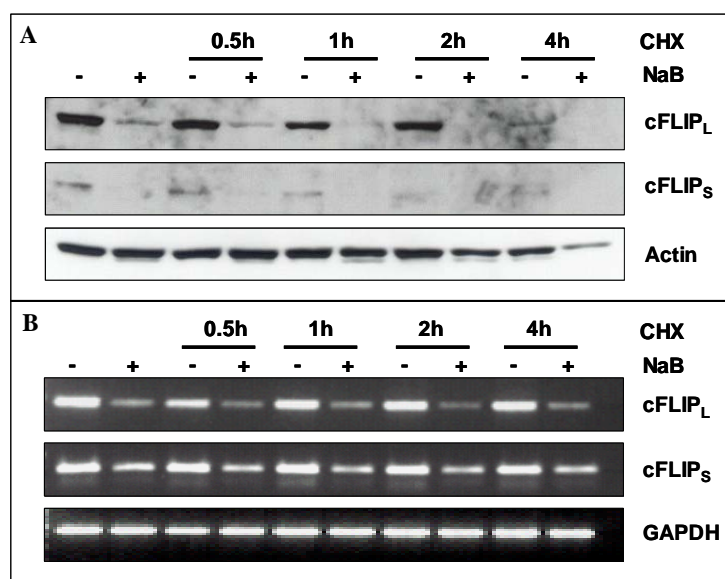


Abb.4.16: HDAC-Hemmung induziert keinen c-FLIP-Repressor. HeLa Zellen wurden 24 h mit NaB behandelt (+) oder blieben unbehandelt (-). In den letzten 4, 2, 1 und 0,5 h wurde Cycloheximid (CHX) zugegeben. Gesamtproteinextrakte wurden im Western Blot untersucht (A), RNA-Extrakte für eine semiquantitative RT-PCR (B) verwendet.

Betrachtet man die c-FLIP_L-Mengen ohne NaB-Zugabe in Abb.4.16A, so wird erkennbar, dass nach 4 h CHX-Behandlung das Protein fast vollständig verschwunden war. c-FLIP_L besitzt also eine Halbwertszeit von über 2 bzw. unter 4 h. c-FLIP_S hingegen hat eine weit geringere Halbwertszeit, denn bereits nach 1 h Behandlung mit CHX war eine Verringerung der Proteinmenge zu sehen. Auf die transkriptionelle Suppression von c-FLIP nach NaB-Behandlung hatte der Translationsinhibitor CHX keinen Effekt, wie in Abb.4.16B zu sehen ist. Daher ließ sich die Induktion eines CHX-labilen c-FLIP-Repressors durch NaB ausschließen.

4.5 Neben transkriptioneller Suppression ist auch eine proteasomale Degradation an der NaB-vermittelten c-FLIP-Reduktion beteiligt

Vergleicht man die c-FLIP-mRNA-Mengen mit den Proteinmengen nach HDAC-Hemmung, so lässt sich beobachten, dass die Reduktion auf Proteinebene stärker ausgeprägt war als die auf mRNA-Ebene. Daher lag die Vermutung nahe, dass neben der transkriptionellen Suppression zusätzliche Mechanismen auf Proteinebene für die verminderten c-FLIP-Proteinmengen verantwortlich sein könnten. Kim et al. haben die Existenz eines induzierbaren Signalweges aufgedeckt, der unter anderem durch die Expression des adenoviralen E1A Proteins induziert werden kann. Die Induktion führt zur Ubiquitinierung und anschließend zur proteasomalen Degradation von c-FLIP (Kim et al., 2002). Um zu untersuchen, ob NaB ebenfalls in der Lage ist eine solche proteasomale Degradation von c-FLIP einzuleiten, wurden HeLa Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt

Für die Inhibition des Proteasoms kann p53 als Marker dienen. Da p53 eine kurze Halbwertszeit hat und durch das Proteasom abgebaut wird, sollte bei der effektiven Hemmung des Proteasoms eine Anreicherung des Proteins vorzufinden sein. Wie in Abb.5.17A gezeigt ist, war dies in der Tat der Fall, womit die Funktionalität des Inhibitors bestätigt wurde. Die Inhibition des Proteasoms durch MG132 in unbehandelten HeLa führte auch zur Akkumulation von c-FLIP_S, woraus sich ableiten ließ, dass die Halbwertszeit von c-FLIP_S unter proteasomaler Kontrolle steht. c-FLIP_L Proteinmengen hingegen blieben durch die Proteasom-Inhibition vollkommen unbeeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass die Halbwertszeit von c-FLIP_L unabhängig vom Proteasom ist.

Die NaB-vermittelte Reduktion der c-FLIP_L-Proteinmengen konnte teilweise durch MG132-Behandlung, sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von TNF α , gehemmt werden. Dies bestätigt, dass zusätzlich zu der transkriptionellen Suppression, NaB eine proteasomale Degradation von c-FLIP_L induziert.

Im Fall von c-FLIP_S konnte die Proteasom-Hemmung nach NaB-Behandlung die Proteinmenge der unbehandelten Probe vollständig wieder herstellen. Da allerdings gezeigt werden konnte, dass die c-FLIP_S-Halbwertszeit proteasomal kontrolliert wird, und Hemmung alleine zu einer c-FLIP_S-Akkumulation führt, ließ sich nicht sagen, inwiefern dieser Effekt auf eine verlängerte Halbwertszeit oder auf eine mögliche Inhibition einer NaB-induzierten proteasomalen Degradation zurückzuführen ist.

Betrachtet man die mRNA-Mengen beider c-FLIP-Formen in Abb.4.17 B, wird deutlich, dass die Hemmung des Proteasoms durch MG132 keinerlei Einfluss auf die Suppression von c-FLIP nach HDAC-Hemmung hatte. Mit diesem Experiment konnte eine mögliche NaB-induzierte proteasomale Degradation eines für die aktive c-FLIP-Expression essentiellen Moleküls ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wurde durch die Apoptose-Quantifizierung gezeigt, dass Inhibition des Proteasoms, die NaB-induzierte Apoptose partiell blockieren konnte (Abb.4.17.C).

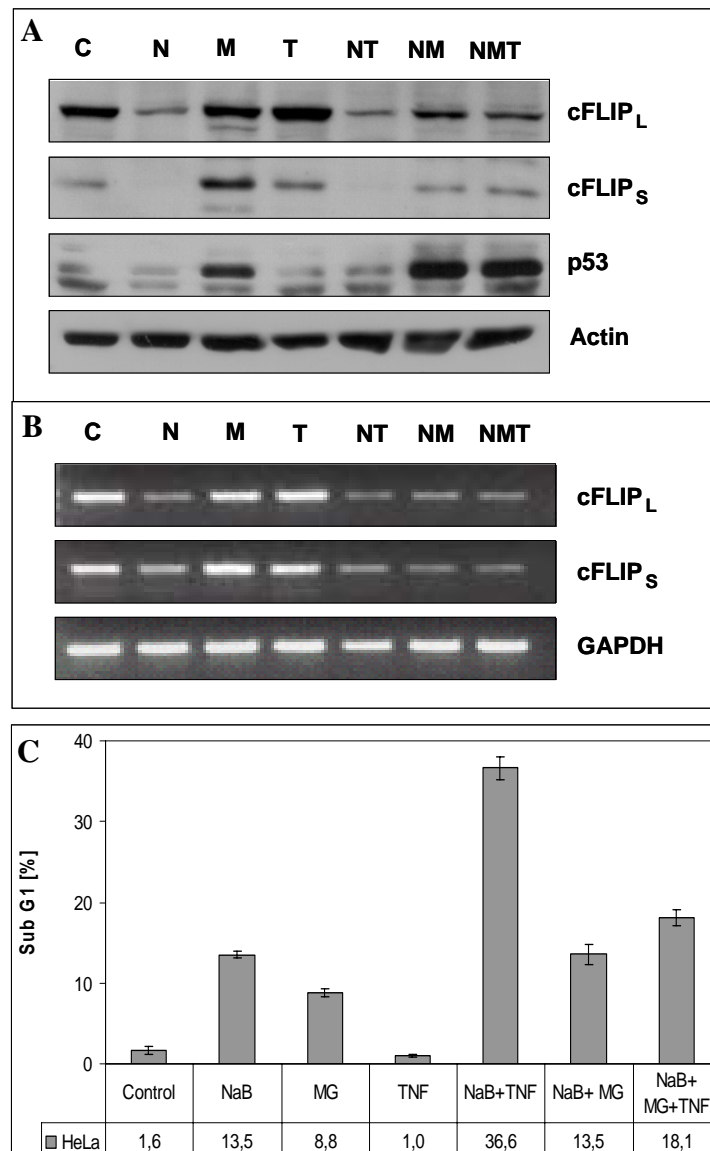


Abb.4.17: Proteasom-Inhibition verhindert teilweise den Verlust an c-FLIP-Protein nach NaB-Behandlung. HeLa Zellen wurden wie folgt behandelt: C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (M): 16 h 10 μ M MG132, (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α , (NM): 6 h NaB + 16 h MG132, (NMT): 6 h NaB + 11 h MG132 + 5 h TNF α . (A) Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte. (B) Semiquantitative RT-PCR. (C) Apoptose-Quantifizierung mittels FCM-Analyse; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Triplets eines Versuches.

4.6 HDAC-Inhibition führt in NaB-resistenten (NaB^R) HeLa Klonen zu keiner Apoptose-Sensibilisierung

In verschiedenen Experimenten wurde festgestellt, dass NaB-Behandlung Zellzyklus-arretierung, intrinsische Apoptose und Sensibilisierung gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose induziert. Nun stellte sich die Frage, ob Zellen sich an die Behandlung mit NaB adaptieren können und Resistenzen entwickeln. Zu diesem Zweck wurden HeLa Zellen 6 Monate lang in 5 mM NaB kultiviert und anschließend durch „single cell cloning“ drei Natriumbutyrat resistente (NaB^R) HeLa Klone isoliert.

4.6.1 Vergleich von NaB^R Klonen mit Wildtyp HeLa bei steigender HDAC-Inhibitor-Konzentration

Nach der Isolation der drei NaB^R HeLa Klone wurde die Wirkung steigender NaB-Konzentrationen im Vergleich zu HeLa untersucht. Hierzu wurden die Zellen 24 h mit 3, 5, 6, 9 und 12 mM NaB behandelt. Nach anschließender Extraktion wurden die Proteinmengen mit Western Blot analysiert.

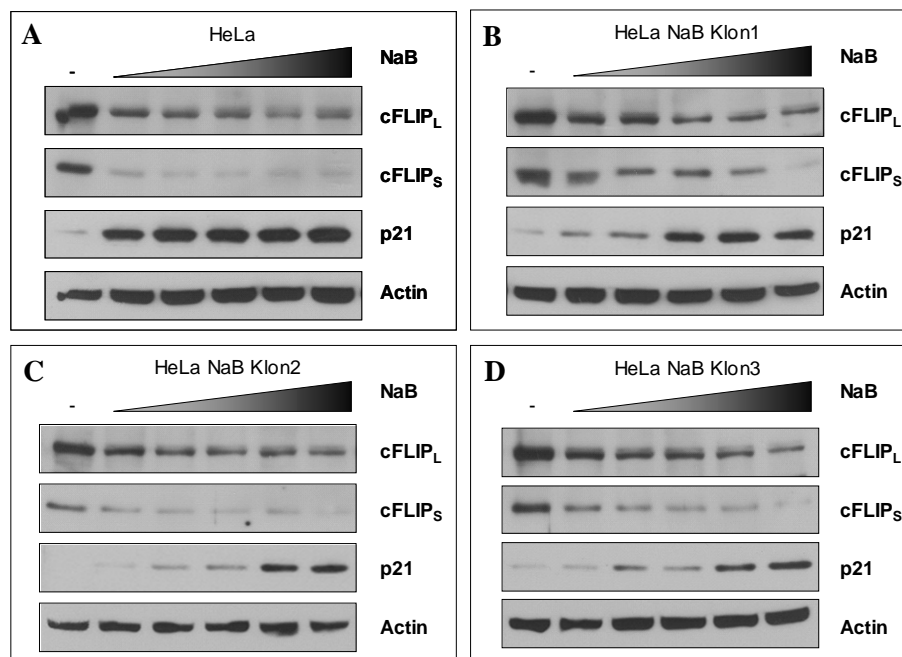


Abb.4.18: Vergleich der NaB^R HeLa Klone mit Wildtyp HeLa nach NaB-Behandlung. Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte von HeLa Zellen und HeLa NaB^R Klonen nach 24 h Behandlung mit 3, 5, 6, 9 und 12 mM NaB.

Betrachtet man in Abb.4.18 A die p21-Induktion, die stets als Indikator für die Wirksamkeit der HDAC-Hemmung verwendet wurde, so ist zu erkennen, dass in Wildtyp HeLa bereits die niedrigste Konzentration von 3 mM NaB zu einer sehr starken Induktion führte, die durch höhere Konzentrationen lediglich geringfügig gesteigert werden konnte. Die NaB^R HeLa Klone (Abb.4.18B, C, D) hingegen wiesen alle eine verringerte p21-Induktion

auf. Erst bei höheren NaB-Konzentrationen von 6 (Klon1) bzw. 9 mM (Klon2, Klon3) zeigte sich eine Erhöhung der p21-Proteinmenge, die allerdings weit unter der Intensität der bei HeLa gefundenen Erhöhung blieb.

Die NaB-induzierte Reduktion des c-FLIP_L-Proteins war in den Klonen im Vergleich zu HeLa leicht gehemmt. Eine etwas stärkere Hemmung konnte bei der c-FLIP_S-Proteinreduktion in den NaB^R Klonen, besonders bei Klon1 (Abb.4.18B), beobachtet werden. Auffällig war, dass die Hemmung der c-FLIP-Reduktion nicht mit der p21-Induktion korrelierte: der Klon, der mit der höchsten p21-Induktion nach NaB-Behandlung reagierte, zeigte die stärkste Hemmung der c-FLIP-Proteinreduktion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die NaB^R HeLa Klone zwar eine stark verringerte p21-Induktion aufwiesen, aber die durch NaB-vermittelte Reduktion der c-FLIP-Proteine nur zum Teil aufgehoben werden konnte.

4.6.2 NaB-induzierte intrinsische Apoptose ist in den NaB^R Klonen stark inhibiert

Im folgenden Versuch sollte die NaB-vermittelte Apoptose in den NaB^R Klonen untersucht werden.

Wie die Apoptose-Quantifizierung nach Behandlung mit unterschiedlichen NaB-Konzentrationen in Abb.4.19A zeigt, war bei Wildtyp HeLa das Maximum der Apoptose bereits bei 6 mM NaB erreicht. Betrachtet man hingegen die NaB^R Klone, stieg bei Klon 1 (Abb.4.19B) die Apoptoserate mit steigender NaB-Konzentration linear an, wobei jedoch auch die höchste NaB-Konzentration nicht das Apoptosemaximum der Wildtyp HeLa erreichte. Im Fall von Klon 2 (Abb.4.19C) betrug die Apoptoserate unter allen Bedingungen nur ca. 4 %. Klon 3 (Abb.4.19D) zeigte eine leicht konzentrationsabhängige und am stärksten ausgeprägte Resistenz gegenüber der NaB-vermittelten Apoptose.

Vergleicht man die p21-Induktion (Abb.4.18) mit der Apoptose in den einzelnen Klonen, ergibt sich eine starke Korrelation beider Ereignisse: Klone mit geringer p21-Induktion wiesen auch eine geringe Apoptoserate auf und umgekehrt.

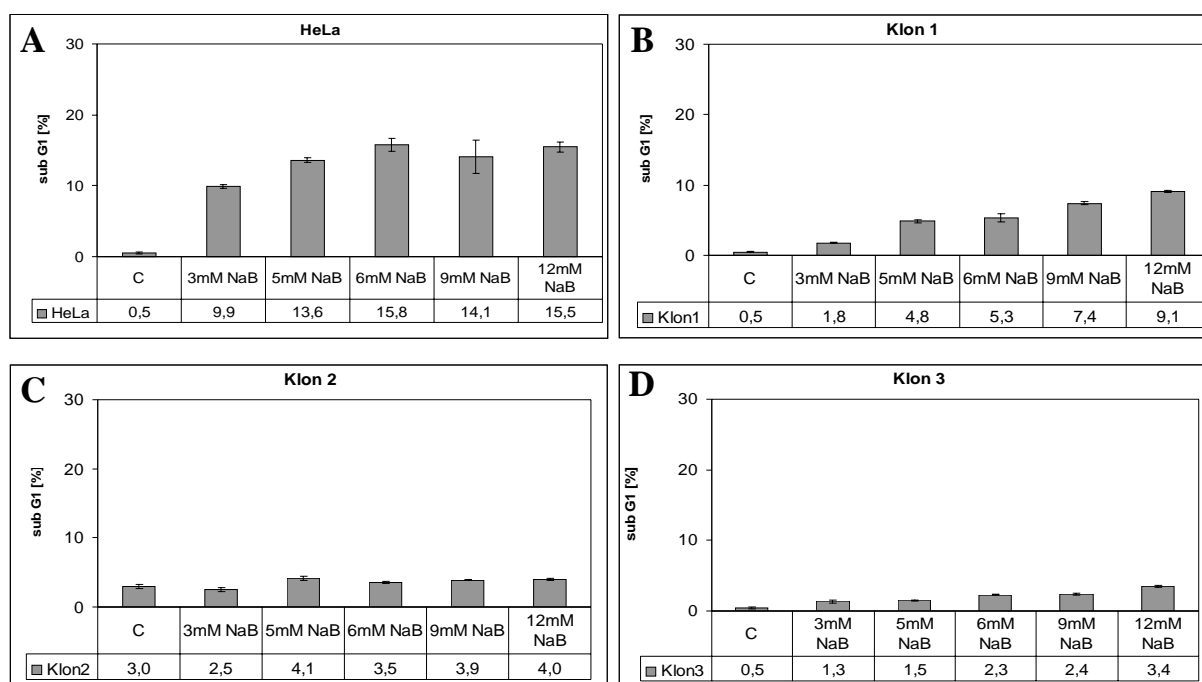


Abb.4.19: Vergleich der NaB-vermittelten Apoptose in den NaB^R HeLa Klonen mit Wildtyp HeLa. HeLa Zellen (A) und die NaB^R Klone (B, C, D) wurden 24 h mit 3, 5, 6, 9 und 12 mM NaB behandelt. Apoptose wurde mittels FCM-Analyse quantifiziert; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Tripletts eines Versuches.

4.6.3 NaB-induzierte Sensibilisierung gegenüber extrinsischer Apoptose ist in NaB^R Klonen fast vollständig inhibiert

Es konnte gezeigt werden, dass die NaB-vermittelte Apoptose in den NaB^R Klonen stark inhibiert war und deutlich mit der verminderten p21-Induktion korrelierte. Keine Korrelation konnte hingegen zwischen c-FLIP Proteinreduktion und p21 Induktion festgestellt werden. Da hier allerdings demonstriert werden konnte, dass reduzierte c-FLIP Mengen essentiell für die Sensibilisierung gegenüber Todesrezeptor-vermittelten Apoptose nach HDAC Inhibition waren, stellte sich die Frage, ob die - wenn auch nur leichte - Inhibition der c-FLIP Degradation in den NaB^R Klonen eine Auswirkung auf die Sensibilisierung hat. Um dies zu untersuchen, wurden Wildtyp HeLa und die drei NaB^R HeLa Klone mit NaB/TNF α behandelt und die Apoptoserate mit Hilfe von FCM Analyse bestimmt. In Abb.4.20 ist deutlich zu erkennen, dass NaB-induzierte Sensibilisierung gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose in den NaB^R Klon vollständig inhibiert.

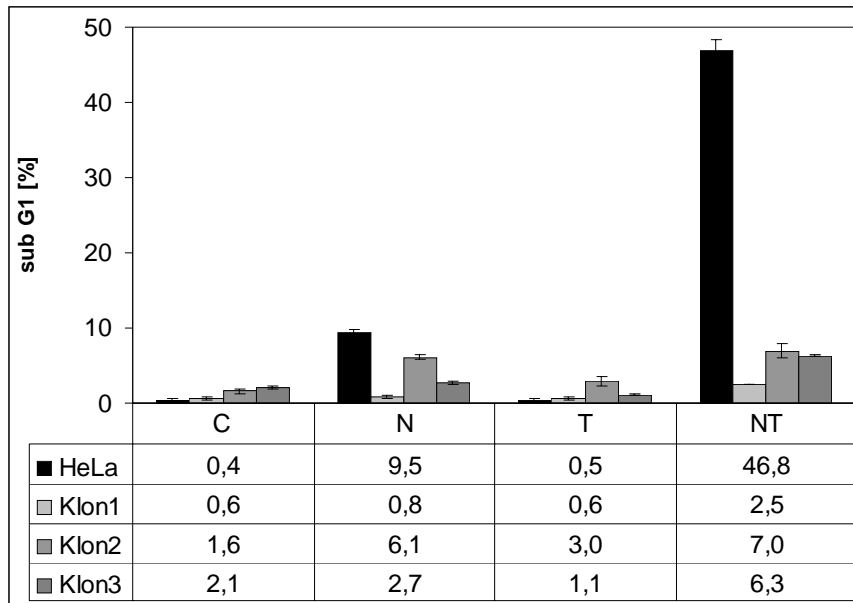


Abb.4.20: NaB-vermittelte Apoptose-Sensibilisierung ist in den NaB^R HeLa Klonen inhibiert. HeLa Zellen und die NaB^R Klone wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . Apoptose wurde mittels FCM-Analyse quantifiziert; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Triplets eines Versuches.

4.7 Therapeutische Relevanz der NaB-induzierten Apoptose-Sensibilisierung

In vorhergehenden Publikationen unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass NaB in Zervixkarzinomzellen G1 Arretierung und eine intrinsische Apoptose induziert (Finzer et al., 2002; Finzer et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass NaB HeLa Zellen zusätzlich zur intrinsischen Apoptose auch gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose sensibilisiert. Im Folgenden wurde die Sensibilisierung im Hinblick auf eine Einsetzbarkeit in der Therapie von Zervixkarzinomen untersucht.

4.7.1 NaB führt auch in HPV-negativen Zellen zu c-FLIP-Suppression

Für den möglichen Einsatz in der Therapie ist es wichtig die Selektivität des Wirkstoffes zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden HPV-negative Zellen verwendet und wie im Schema in Abb.4.1 dargestellt mit NaB/TNF α behandelt.

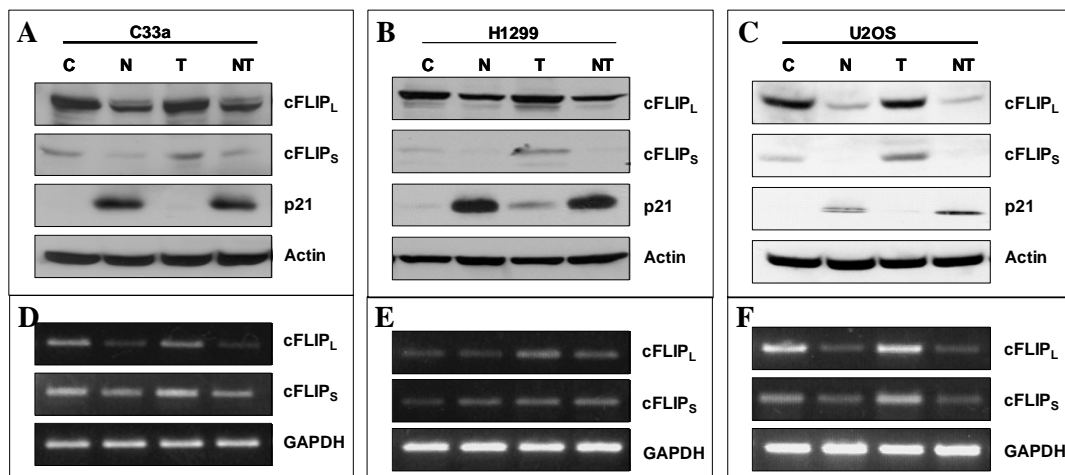


Abb.4.21: c-FLIP-Regulation nach HDAC-Inhibition in HPV-negativen Zellen. C33a, H1299 und U2OS wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . (A, B, C) Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte. (D, E, F) Semiquantitative RT-PCR.

NaB induzierte in der HPV-negativen Zervixkarzinomzelllinie C33a eine Reduktion des c-FLIP_L- und des c-FLIP_S-Proteins (Abb.4.21A). Mittels RT-PCR in Abb.4.21D konnte bewiesen werden, dass die Proteinreduktion auf die transkriptionelle Suppression zurückzuführen war. Im Falle der NSCL („non-small cell lung“)- Karzinom Zelllinie H1299 war die c-FLIP-Proteinreduktion nur sehr gering, wie in Abb.4.21B zu sehen ist. Dies spiegelt sich ebenfalls in der RT-PCR in Abb.4.21E wider. In der Osteosarkomzelllinie U2OS war die c-FLIP-Proteinreduktion (Abb.4.21 C) und die Reduktion der mRNA (Abb.4.21F) am stärksten ausgeprägt und quantitativ vergleichbar mit der Reduktion in den HeLa Zellen (siehe Abb.4.13).

4.7.2 NaB induziert in HPV-negativen Zellen keine Apoptose

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass NaB auch in HPV-negativen Zelllinien zu c-FLIP-Reduktion führt, allerdings in jeder Zelllinie in unterschiedlichem Ausmaß. Um nun zu untersuchen welche Auswirkungen dies auf die Apoptose-Induktion durch NaB und die Sensibilisierung gegenüber der TNF α -vermittelten Apoptose hat, wurden die verschiedenen Zelllinien mit NaB/TNF α behandelt, und die Apoptose quantifiziert. In Abb.4.22 ist dargestellt, dass in keiner der Zelllinien weder durch NaB-Behandlung Apoptose induziert, noch für die TNF α -vermittelte Apoptose sensibilisiert werden konnte.

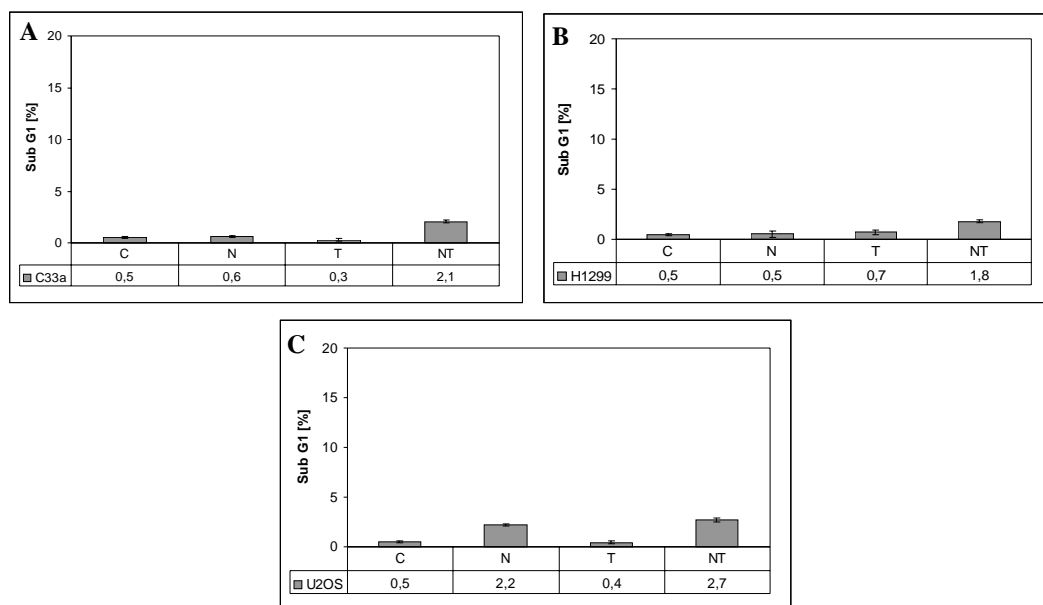


Abb.4.22: NaB induziert in HPV-negativen Zelllinien keine Apoptose. C33a (A), H1299 (B) und U2OS (C) wurden wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . Apoptose wurde mittels FCM-Analyse quantifiziert; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Triplets eines Versuches.

4.7.3 siRNA gegen HPV18 verhindert die HDAC-Inhibitor-induzierte Apoptose-Sensibilisierung

Aus dem vorhergehenden Experiment ergab sich die Frage, ob die Anwesenheit von HPV eine Voraussetzung für die Apoptose-Sensibilisierung darstellt. Um das zu untersuchen, wurde in HeLa Zellen mittels siRNA HPV18 E6/E7 runterreguliert, bzw. zur Kontrolle siRNA gegen Luciferase herangezogen. 48h nach der siRNA Transfektion wurden die Zellen nach dem Schema in Abb.4.1 behandelt. Wie in Abb. 4.23 zu sehen ist, führte die HPV18-siRNA zu einer sehr starken Reduktion des E7-Proteins, so dass es nicht mehr zu detektieren war. Betrachtet man den Einfluss von NaB auf E7, so wird deutlich, dass dieser in nicht-transfizierten HeLa die E7-Proteinmenge nicht beeinflusste, während in den Kontroll-siRNA

transfizierten Zellen E7 deutlich reduziert wurde. Die Kombination von NaB und TNF α allerdings zeigte in beiden Fällen eine klare E7-Reduktion.

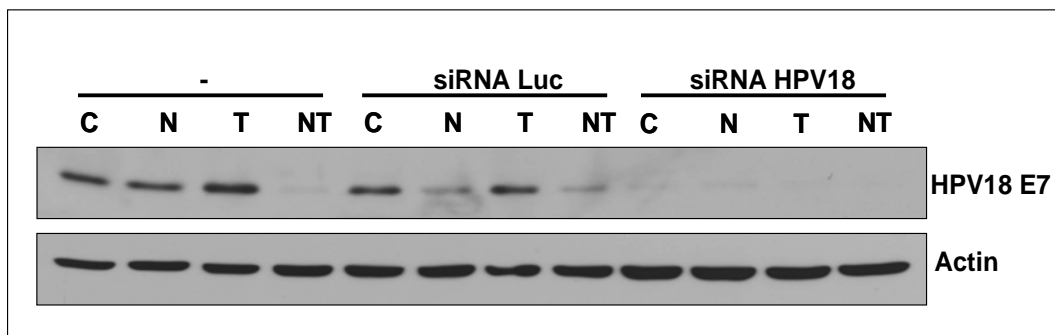


Abb.4.23: HPV18-siRNA führt zur starken Reduktion der E7-Proteinmenge. HeLa Zellen wurden transfiziert mit HPV18 siRNA oder Kontroll siRNA gegen Luciferase (Luc) 48 h nach Transfektion wurden die Zellen wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . Gesamtproteinextrakte wurden im Western Blot untersucht.

Es konnte auch in Abwesenheit von E7 eine HDAC-Inhibitor-vermittelte Reduktion von c-FLIP sowohl auf Protein als auch auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abb.4.24).

Als Marker für die Aktivierung der Caspase 3, die als Exekutions-Caspase gilt und nach deren Aktivierung es unweigerlich zur Vollendung der Apoptose kommt (siehe Abschnitt 1.2), kann die proteolytische Spaltung von PARP („*poly (ADP-ribose) polymerase*“) herangezogen werden (Kaufmann et al., 1993). In den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurde die proteolytische Spaltung von PARP durch NaB stark induziert, unabhängig von der zusätzlichen Stimulation mit TNF α (Abb.4.25). Nach Ausschaltung von HPV18 war diese Induktion der PARP-Spaltung im Falle der NaB-Behandlung fast vollständig, im Falle der kombinierten NaB/ TNF α Behandlung stark inhibiert.

Mit diesen Experimenten konnte deutlich gezeigt werden, dass HPV18 in HeLa für die NaB-induzierte Caspase 3 Aktivierung, und somit sowohl für die intrinsische Apoptose nach NaB-Behandlung, wie auch für die NaB-vermittelte Apoptose-Sensibilisierung gegenüber TNF α essentiell ist.

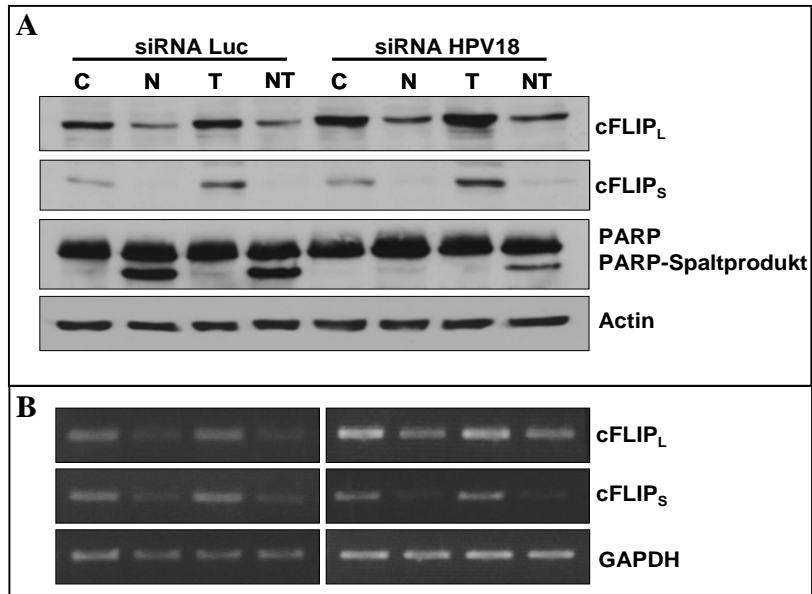


Abb.4.24: HPV18-siRNA führt zur starken Reduktion der E7-Proteinmenge. HeLa Zellen wurden transfiziert mit HPV18 siRNA oder Kontroll siRNA gegen Luciferase (Luc). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen wie folgt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h 6 mM NaB, (T): 5 h 100 U/ml TNF α , (NT): 19 h NaB + 5 h TNF α . Western Blot Analyse der Gesamtproteinextrakte (A). Semiquantitative RT-PCR (B).

4.7.4 Konditioniertes Medium von primären Makrophagen induziert Apoptose in HeLa nach NaB-Behandlung

Bei vielen Zervixkarzinomen kommt es *in vivo* zur Einwanderung von so genannten Tumorassoziierten Makrophagen („*tumour associated macrophages*“, TAMs) (Heller et al., 2003). Ihre Anwesenheit wird mit schlechten klinischen Prognosen und einem Fortschreiten der Erkrankung verbunden, da sie Anergie gegenüber Cytokintherapie und Apoptose in Natürlichen Killer Zellen und T-Zellen induzieren (Hansson et al., 1999). Aktivierte Makrophagen sind aber auch dafür bekannt, dass sie TNF α sezernieren. Daraus ergab sich die Frage, ob das von diesen Makrophagen gebildete TNF α ausreicht, Apoptose nach NaB-Behandlung zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden primäre Makrophagen aus humanem Blut isoliert. Zur Gewinnung des sezernierten TNF α wurden diese 24 h mit normalem Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium von den Makrophagen abgenommen und durch Zentrifugation von Zellen befreit.

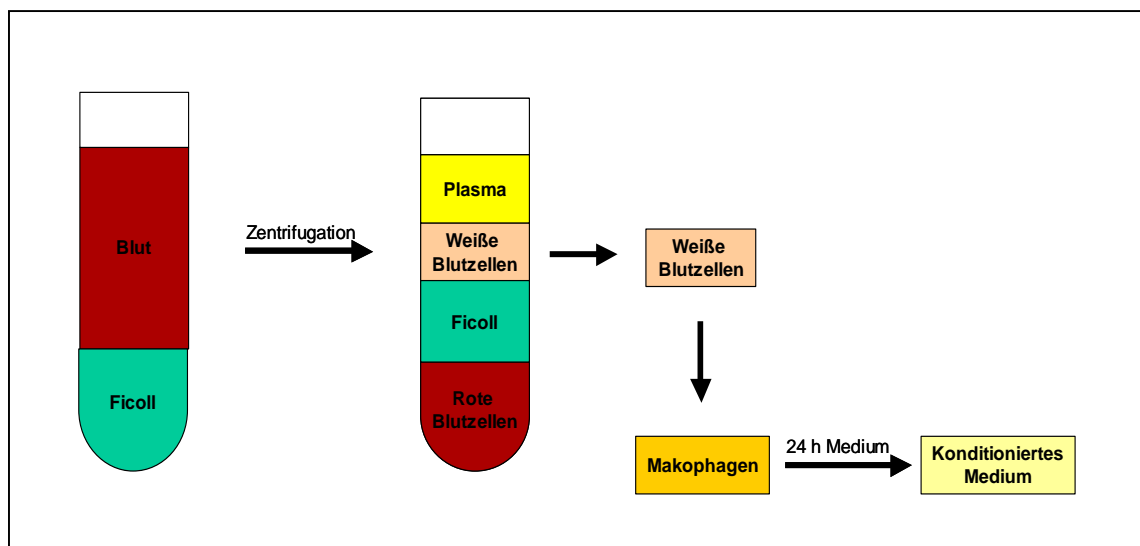


Abb.4.25: Gewinnung des konditionierten Mediums. Frisches humanes Blut wurde in einem 50 mL Reaktionsbehälter über Ficoll gegeben und durch Zentrifugation in seine Bestandteile aufgetrennt. Weiße Blutzellen wurden isoliert und durch Depletion die Makrophagen gewonnen. Auf die Makrophagen wurde für 24 h normales Kulturmedium komplett gegeben, anschließend zentrifugiert, um das Medium von Zellen zu trennen. Das so gewonnene Medium wurde als konditioniertes Medium bezeichnet.

Das konditionierte Medium wurde nun anstatt des rekombinanten TNF α verwendet. Um auszuschließen, dass andere Komponenten des konditionierten Mediums einen möglichen Effekt verursachen, wurde zur Kontrolle das konditionierte Medium zusätzlich mit einem TNF α -neutralisierenden Antikörper inkubiert. HeLa Zellen wurden nun wie in Abb.4.26 zur Verdeutlichung dargestellt, behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen in 70 % Ethanol fixiert und die Apoptoserate mit Hilfe von FCM-Analyse bestimmt.

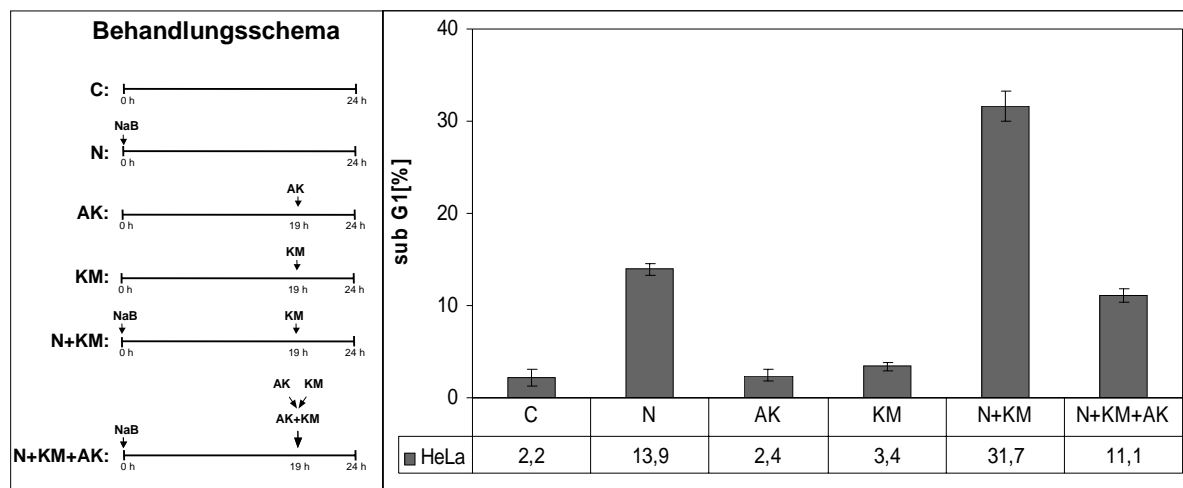


Abb.4.27: Konditioniertes Medium von aktivierten Makrophagen induziert Apoptose in HeLa nach NaB-Vorbehandlung. HeLa Zellen wurden wie im Behandlungsschema dargestellt behandelt: (C): unbehandelt, (N): 24 h NaB, (AK): 5 h TNF α neutralisierender Antikörper, (KM): 5 h konditioniertes Medium, (N+KM): 19 h NaB + konditioniertes Medium, (N+KM+AK): 19 h NaB + 5 h konditioniertes Medium und Antikörper, die vor Zugabe vermischt wurden. Apoptose wurde mittels FCM-Analyse quantifiziert; Sub-G1-Fraktion (Angabe in Prozent) entspricht apoptotischen Zellen. Dargestellt sind Tripletts eines Versuches.

Wie in Abb.4.24 zu erkennen ist, hatten weder das konditionierte Medium, noch der TNF α -neutralisierende Antikörper einen apoptotischen Effekt. Die Vorbehandlung mit NaB und anschließende Inkubation mit konditioniertem Medium hingegen führte zu einem dramatischen Anstieg der Apoptoserate. Die Zugabe des TNF α -neutralisierenden Antikörpers konnte diesen Anstieg auf die Apoptoserate der NaB behandelten Zellen reduzieren, womit demonstriert werden konnte, dass primäre Makrophagen ausreichend TNF α produzieren können, um nach NaB-Inkubation, statt rekombinantem TNF α , Apoptose zu induzieren. Zusätzlich wurde mit Hilfe des TNF α -neutralisierenden Antikörpers gezeigt, dass ausschließlich TNF α für die Apoptose-Induktion verantwortlich war.

5. Diskussion

Die Eigenschaft von Tumoren zu expandieren, wird nicht nur durch uneingeschränkte Proliferation bestimmt, sie besitzen darüber hinaus die Fähigkeit sich der Apoptose zu entziehen (Igney and Krammer, 2002b). In vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren in der Lage sind, beides zu blockieren, indem Wachstumsarretierung und intrinsische Apoptose in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen induziert wird (Finzer et al., 2004; Finzer et al., 2001). In dieser Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Zervixkarzinomzelllinie HeLa, die vollständig resistent gegenüber der TNF α - und TRAIL-vermittelten Apoptose ist, durch HDAC-Inhibition für diese Todesliganden sensibilisiert werden konnte. Zusätzlich konnte auch die CD95L-induzierte Apoptose durch Vorbehandlung mit NaB (oder TSA, Daten nicht gezeigt) signifikant verstärkt werden (Abb.4.2).

5.1. Die zwei Ebenen der c-FLIP-Regulation

Die Sensibilisierung für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose ging einher mit der Suppression der anti-apoptotischen c-FLIP-Proteine c-FLIP_L und c-FLIP_S. Durch stabile Expression von c-FLIP konnte die Apoptose-Induktion blockiert werden. Diese Resultate bestätigen die anti-apoptotische Eigenschaft beider c-FLIP-Isoformen.

c-FLIP_L und c-FLIP_S üben ihre Funktionen auf unterschiedliche Weise aus. Zum Beispiel begünstigt c-FLIP_L sogar den ersten Spaltungsschritt der Caspase 8, während c-FLIP_S bereits diesen inhibiert (Poukkula et al., 2005; Hietakangas et al., 2003; Krueger et al., 2001b). Hier wurde gezeigt, dass die beiden Isoformen auch die Apoptose-Sensibilisierung nach HDAC-Hemmung unterschiedlich beeinflussen: während stabile Expression von c-FLIP_S das Ausmaß der Sensibilisierung nur teilweise reduzieren konnte (Abb.4.4B), war die stabile Expression von c-FLIP_L in der Lage diese vollständig zu verhindern (Abb.4.6B).

Die unterschiedliche Rolle beider c-FLIP-Proteine bei der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose konnte ebenfalls durch Proteasom-Inhibition beobachtet werden. Die c-FLIP_S-Proteinmenge wurde dabei auf das Niveau der unbehandelten Zellen angehoben, während c-FLIP_L nur partiell vor der Degradation geschützt werden konnte (Abb.4.17A). Dies hatte auch nur eine partielle Aufhebung der Apoptose-Sensibilisierung zur Folge (Abb.4.17C).

Die Funktion von c-FLIP_L hängt von der Expressionsmenge des Proteins ab. Niedrige Mengen verstärken die Ausbildung des DISC - wirken also pro-apoptotisch - während erst höhere Proteinmengen, wie in vielen Tumoren zu finden, einen anti-apoptotischen Effekt aufweisen (Chang et al., 2002). Artifizuell hohe Proteinkonzentrationen wirken sogar zytotoxisch (Chang et al., 2002). In den Experimenten dieser Arbeit konnte eine solche Korrelation allerdings nicht beobachtet werden. Die Wirkung von c-FLIP_L war stets anti-apoptotisch, wobei Klon #3, der sehr hohe Proteinmengen produzierte, die Apoptose nur

wenig stärker inhibierte als Klon #6, der ein mit dem endogenen vergleichbare c-FLIP_L-Proteinexpression aufwies (Abb.4.6 B). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte zum einen die Art der Apoptose-Induktion bieten. Chang et al. haben ihre Untersuchungen im Bezug auf die CD95-vermittelte Apoptose durchgeführt, während hier die TNF α -induzierte Apoptose untersucht wurde. Zum anderen könnte der endogene Expressionsbereich des c-FLIP_L-Proteins in HeLa bereits über der Schwelle der anti-apoptotischen Mengen liegen.

Zusammenfassend waren hier beide c-FLIP-Isoformen eindeutig anti-apoptotisch, wobei c-FLIP_L die Apoptose effektiver inhibieren konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von c-FLIP_L nicht durch das Proteasom kontrolliert wird, da c-FLIP_L-Proteinmengen in ansonsten unbehandelten HeLa Zellen allein durch Proteasom-Hemmung nicht beeinflusst wurden (Abb.4.17A). Die kombinierte Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor und NaB zeigte, dass das Ausmaß der NaB-vermittelten c-FLIP_L-Proteinreduktion, bei gleich bleibenden mRNA-Mengen, verringert werden konnte. Da die Halbwertszeit des c-FLIP_L-Proteins nicht vom Proteasom abhängt, kann dieser Effekt nicht auf eine verlängerte Halbwertszeit zurückgeführt werden, sondern zeigt, dass NaB zusätzlich zur transkriptionellen Repression von c-FLIP_L eine proteasomale Degradation induziert. Allerdings konnten in den c-FLIP_L-Klonen keine reduzierten Proteinmengen nach NaB-Behandlung beobachtet werden (Abb.4.6A). Wenn man davon ausgeht, dass NaB eine proteasomale c-FLIP_L-Degradation induziert, sollte dies auch bei ektoisch exprimierten c-FLIP_L-Proteinen der Fall sein. Poukkula et al. konnten ebenfalls beobachten, dass ektoisch exprimierte FLAG-c-FLIP-Proteine, im Gegensatz zu endogenen c-FLIP, durch Induktion des proteasomalen Abbaus nicht degradiert wurden (Poukkula et al., 2005), was auf eine vermutete Sättigung der Abbau-Maschinerie zurückgeführt wurde.

Da der einzige Unterschied zwischen dem endogenen und dem ektoischen c-FLIP_L das FLAG-Epitop ist, könnte man auch vermuten, dass dieses eventuell eine proteasomale Degradation verhindert, indem es z.B. Regionen maskiert, die für die Degradation des Proteins wichtig sein könnten.

Im Unterschied zu c-FLIP_L wurde bei c-FLIP_S nach Inhibition des Proteasoms mit MG132 eine Akkumulation des endogenen Proteins vorgefunden (Abb.4.17A), was den isoformspezifischen Abbau von c-FLIP bestätigt (Poukkula et al., 2005). Zudem zeigt dieses Ergebnis, dass die Halbwertszeit von basalem c-FLIP_S durch das Proteasom kontrolliert wird. Bisherige Untersuchungen haben für beide c-FLIP-Isoformen lediglich über einen induzierbaren Abbau über den proteasomalen Weg berichtet (Kim et al., 2002). Die NaB-induzierte c-FLIP_S-Proteinreduktion wurde durch die Hemmung des proteasomalen Abbaus nicht nur teilweise, wie es bei c-FLIP_L beobachtet werden konnte, sondern vollständig verhindert, so dass die c-FLIP_S-Proteinmenge mit den unbehandelten Zellen vergleichbar war (Abb.4.17 A). Dies lässt sich zum einen auf eine verlängerte Halbwertszeit zurückführen. Ob die NaB-Behandlung allerdings auch im Fall von c-FLIP_S, wie bei c-FLIP_L, eine zusätzliche proteasomale Degradation induziert, lässt sich durch diesen Versuch nicht klären.

Die NaB-induzierte Apoptose-Sensibilisierung ist bei gleichzeitiger Hemmung des Proteasoms stark - wenn auch nicht vollständig - inhibiert (Abb.4.17 C). Da aber unter diesen Bedingungen im Fall von c-FLIP_S nicht zwischen verlängerter Halbwertszeit und einer zusätzlich möglichen NaB-induzierter Degradation unterschieden werden kann, lässt sich auch keine eindeutige Aussage über die Relevanz dieses zusätzlichen Mechanismus der proteasomalen Degradation auf die Apoptose-Sensibilisierung machen.

5.2 Die Regulation der c-FLIP-Transkription

NF- κ B wurde als ein wichtiger Faktor für die c-FLIP-Expression beschrieben (Kumar et al., 2004). Hemmung von NF- κ B wurde für die Apoptose-Sensibilisierung gegenüber TNF α (Wang et al., 1999; Wang et al., 1996) und TRAIL (Ravi et al., 2001) induzierter Apoptose, sowie für den pro-apoptotischen Effekt von HDAC-Inhibitoren (Takada et al., 2006) verantwortlich gemacht. In der vorliegenden Arbeit haben EMSA-Analysen ergeben, dass in unstimulierten HeLa Zellen NF- κ B p50-Homodimere und p50/p65-Heterodimere konstitutiv an die DNA gebunden waren. Diese konstitutive NF- κ B-Aktivität wurde mit Apoptose-Hemmung und Krebsentstehung assoziiert (Karin et al., 2002). NaB-Behandlung führte zu einer Reduktion der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität, sowie zu einer Hemmung der TNF α -induzierten verstärkten NF- κ B DNA-Bindung. Die DNA-Bindung der p50/p65-Heterodimere war stark gehemmt, während die der p50-Homodimere vollständig inhibiert wurde (Abb.4.7). Zusätzlich zum Verschwinden der p50-Homodimere konnte eine Suppression des NFKB1 Gens festgestellt werden, welches für das Vorläuferprotein p105 von p50 kodiert (Abb.4.8). Gleichzeitig blieben die Protein und mRNA Mengen von p65 unverändert. Dies könnte eine Erklärung liefern, weshalb p50-Homodimere im Besonderen vollständig verschwunden und p50/p65-Heterodimere lediglich reduziert wurden.

Homodimere, bestehend aus p50, gelten als transkriptionelle Repressoren, da p50 keine Transaktivierungsdomäne besitzt und daher die Bindung von p50-Homodimeren an NF- κ B Bindungsstellen in Promotoren die Bindung von transaktivierenden NF- κ B-Dimeren verhindert (Franzoso et al., 1992). Bcl-3 kann jedoch mit p50-Homodimeren assoziieren und die Transkription aktivieren (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993). Zusätzlich wurde beschrieben, dass das aminoternale Ende von Bcl-3 für eine effektive Translokation von p50 in den Zellkern erforderlich ist (Zhang et al., 1994). Durch HDAC-Inhibition wurde Bcl-3 auf Proteinebene reduziert (Abb.4.10). Wenn man bedenkt, dass in Abwesenheit von Bcl-3 p50-Homodimere repressiv wirken und die Translokation von p50 in den Zellkern inhibiert ist, kann man annehmen, dass dies zur Verringerung der transaktivierenden Wirkung von NF- κ B-Dimeren führt. Da NFKB1 durch die Anwesenheit von NF- κ B-Bindungsstellen in seinem Promotor autoreguliert ist, könnte die Verringerung der transaktivierenden NF- κ B-Dimere zu einer NFKB1 Suppression führen, und schließlich auf das vollständigen Verschwinden der p50-Homodimere hinauslaufen.

Die Bcl-3-Expression kann selbst durch NF- κ B reguliert werden (Ge et al., 2003). Mit Hilfe von Northern Blot Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von Bcl-3 durch NaB nicht inhibiert wurde (Abb.4.10 B); die Regulation fand ausschließlich auf Proteinebene statt.

Die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B kann auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden, unter anderem über die Translokation in den Zellkern (Karin et al., 2002). Krämer et al. (Kramer et al., 2006) haben gezeigt, dass durch HDAC-Hemmung die Translokation von p65 verhindert wird, obwohl keine Regulation auf Proteinebene festzustellen ist. Allerdings wurden diese Untersuchungen in einem anderen Zellsystem, nämlich in Melanomzellen, und mit dem HDAC Inhibitor Valproinsäure durchgeführt, was eine mögliche Erklärung bietet, dass in der vorliegenden Arbeit die Anwesenheit von p65 im Zellkern nach NaB-Behandlung unverändert blieb. Auch die durch TNF α -induzierte verstärkte Translokation von p65 wurde durch NaB-Gegenwart nicht beeinflusst. Deshalb lässt sich die durch NaB-vermittelte NF- κ B-Inhibition zweifelsfrei p50 zuordnen (Abb.4.9).

TNF α -induzierte NF- κ B-Aktivierung beruht auf der Ubiquitinierung und darauf folgender Degradation von I κ B α , das im unstimulierten Zustand NF- κ B durch Bindung im Cytoplasma festhält. I κ B α -Degradation setzt NF- κ B frei und ermöglicht so dessen Translokation in den Zellkern, um dort κ B empfindliche Elemente zu aktivieren (Zandi and Karin, 1999). Takada et al. haben gezeigt, dass HDAC-Hemmung die TNF α -induzierte I κ B α -Degradation verhindern kann, was zu verstärkter Apoptose führt (Takada et al., 2006). NaB-Behandlung im vorliegenden Fall konnte die I κ B α -Degradation allerdings nicht beeinflussen (Abb.4.4 C und 4.6 C), was darauf hinweist, dass die NaB-vermittelte NF- κ B-Hemmung unabhängig von I κ B α stattfindet.

Die NF- κ B-Hemmung konnte als Ursache für die NaB-vermittelte c-FLIP-Suppression ausgeschlossen werden. Zum einen hatte die NF κ B1-Depletion mittels siRNA keinerlei Effekt auf die c-FLIP-mRNA-Mengen, obwohl p105 auf Proteinebene komplett verschwunden und p50 auf ein Maß reduziert war, das vergleichbar mit dem bei NaB Anwesenheit (Abb.4.13 A) war. Die Unterschiede in den Proteinmengen von p105 und p50 lassen sich durch die längere Halbwertszeit des p50 Proteins im Vergleich zu p105 erklären (Cressman and Taub, 1994). Zum anderen zeigte der NF κ B1-defiziente HeLa Klon (HeLa p50-) - der eine signifikant reduzierte p50-Proteinmenge im Vergleich zu HeLa aufwies - eine geringere c-FLIP-Proteinexpression aber keinen Unterschied in der c-FLIP-Regulation nach NaB-Behandlung. Allerdings war p50 in dem HeLa p50- Klon nicht vollständig abwesend und zusätzliche TNF α -Stimulation konnte die p50-Expression wieder induzieren (Abb.4.14).

Auch die Resultate bezüglich Bcl-3 sprechen gegen eine Beteiligung von NF- κ B an der c-FLIP-Suppression. Bcl-3 wurde durch NaB-Behandlung auf Proteinebene reduziert (Abb.4.10). Mit Hilfe der zwei Zelllinien 444 und CGL3, die sehr unterschiedliche Mengen von Bcl-3 exprimieren, konnten gezeigt werden, dass die unterschiedliche Expression dieses Proteins keinerlei Einfluss auf die c-FLIP-Regulation hatte, weder im unbehandelten Zustand

noch in Gegenwart von NaB (Abb.4.12 A). Dies spiegelte sich ebenfalls in der Apoptose-Sensibilisierung wider, wo keine Unterschiede der beiden Zelllinien untereinander und im Vergleich zu HeLa festzustellen waren (Abb.4.12 B). Aus diesem Grund kann Bcl-3 nicht an der HDAC-Inhibitor induzierten c-FLIP-Repression beteiligt sein. Unter der Annahme, dass reduzierte Bcl-3-Mengen zu einer Verringerung von transaktivierenden NF- κ B-Dimeren führen, deuten diese Resultate darauf hin, dass die c-FLIP-Expression unabhängig von NF- κ B reguliert wird.

Durch Experimente, bei denen HeLa Zellen nach 24-stündiger NaB-Behandlung noch mal 24 h in normalem Kulturmedium inkubiert wurden, konnte endgültig ausgeschlossen werden, dass die NaB-induzierte c-FLIP Suppression über die NF- κ B-Hemmung vermittelt wird. In diesen Zellen konnte festgestellt werden, dass die c-FLIP-Proteinmengen wieder soweit erhöht waren, dass sie nahezu das Niveau unbehandelter Zellen erreicht hatten. Unter gleichen Bedingungen wiesen p105- und p50-Proteinmengen keinen Unterschied zu Zellen unmittelbar nach der 24-stündigen NaB-Behandlung auf (Abb.4.15). NaB verursacht die Hemmung der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität ausschließlich über p50. Da aber in Abwesenheit von p50 c-FLIP wieder reinduziert wurde, kann die NaB-vermittelte NF- κ B-Hemmung als Ursache für die c-FLIP-Suppression ausgeschlossen werden.

Die transkriptionelle Regulation von c-FLIP wird nicht nur mit NF- κ B (Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001), sondern auch mit MKK („*mitogen-activated protein kinase kinase*“) (Yeh et al., 1998;Schlapbach et al., 2000) und PI3K-Akt (Panka et al., 2001; Skurk et al., 2004) in Verbindung gebracht. In dem vorliegenden Fall hatte aber weder der spezifische MKK Inhibitor PD98059, noch der PI3K Inhibitor LY294002 einen Einfluss auf die c-FLIP-Mengen (Daten nicht gezeigt).

Die direkte Repression von c-FLIP durch c-Myc wurde als bestimmender Faktor für die TRAIL-Sensibilität identifiziert (Ricci et al., 2004). Hier konnte allerdings beobachtet werden, dass c-Myc-Proteinmengen nach HDAC-Inhibition minimal reduziert wurden (Daten nicht gezeigt). Also das Gegenteil von dem, was zu erwarten wäre, hätte c-Myc eine kausale, repressive Rolle bei der NaB-vermittelten c-FLIP-Reduktion. Daher lässt sich auch c-Myc ausschließen.

5.3 HDAC-Inhibitor-induzierte Apoptose-Sensibilisierung

Eine Sensibilisierung gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose erscheint sehr erstrebenswert für die Therapie von Gebärmutterhalskrebs. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass lösliches rekombinantes TRAIL in Tumorzellen selektiv Apoptose auslöst, ohne gleichzeitige systemische Toxizität (Walczak et al., 1999; Ashkenazi and Dixit, 1998; Smyth and Kershaw, 2003). Obwohl HeLa Zellen resistent gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptose sind, zeigte eine Kombination von NaB-Vorbehandlung und anschließender Zugabe von rekombinantem TRAIL eine sehr starke Apoptose-Induktion (Abb.4.2 B).

Neben der Sensibilisierung gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose, konnte NaB ebenfalls die TNF α -vermittelte Apoptose einleiten. TNF α wird von Lymphozyten – aber auch von Makrophagen (Tartaglia and Goeddel, 1992) - sezerniert, die auch in Tumoren vorkommen können (Pollard, 2004). Im Besonderen für Zervixkarzinome sind Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) beschrieben worden (Heller et al., 2003). Diese TAMs werden jedoch meist mit einer schlechten klinischen Prognose und einem Fortschreiten des Krebses in Verbindung gebracht, da sie Resistenzen gegenüber Cytokintherapie und in Natürlichen Killerzellen und T-Zellen Apoptose auslösen (Heller et al., 2003). Interessanterweise konnte hier gezeigt werden, dass das von primären Makrophagen sezernierte TNF α ausreicht, um in HeLa Zellen nach NaB-Behandlung Apoptose zu induzieren (Abb.4.24). Für eine Anwendung von HDAC-Inhibitoren in der Therapie von Zervixkarzinomen sind diese Resultate sehr vielversprechend. HDAC-Inhibitoren allein sind in der Lage G1 Arretierung in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen und intrinsische Apoptose einzuleiten. Da die HDAC-Inhibition ebenfalls zur Sensibilisierung gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose führt, könnte die TNF α -Sekretion durch TAMs die Apoptoserate um ein Vielfaches erhöhen. Somit würde die Anwesenheit dieser Makrophagen, die meist als schlechte klinische Prognose gewertet wurde, sogar therapieunterstützend wirken.

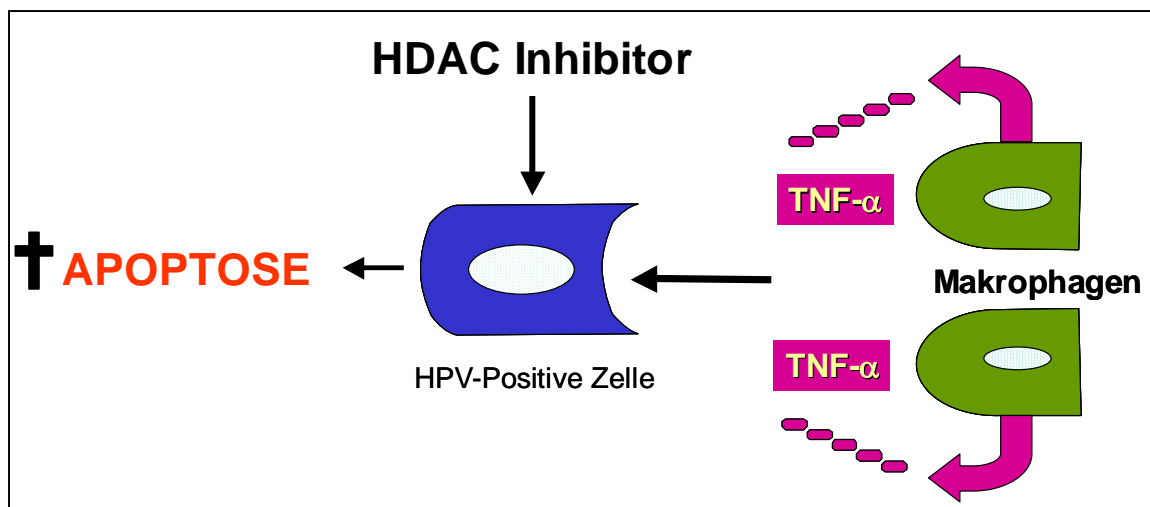


Abb.5.1: Modell der Apoptose-Induktion durch HDAC-Inhibition und Makrophagen *in vivo*. HPV-positive Zervixkarzinomzelle umgeben von Tumor assoziierten Makrophagen. HDAC-Inhibition induziert in der Zervixkarzinomzelle intrinsische Apoptose und sensibilisiert sie für die TNF α -induzierte Apoptose. Das von Makrophagen sezernierte TNF α führt zu einer dramatischen Erhöhung der Apoptoserate. Mit Hilfe eines HDAC-Inhibitors kann so die Anwesenheit Tumor assoziierter Makrophagen, die meist mit schlechter klinischer Prognose zusammenhing, in eine gute klinische Prognose umgewandelt werden.

Durch stabile Expression von c-FLIP-Proteinen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Verringerung der c-FLIP-Mengen essentiell für den synergistischen Effekt zwischen NaB und TNF α /TRAIL ist (Abb.4.4 B und 4.6 B). Dieser Effekt konnte in HPV-negativen Zellen allerdings nicht beobachtet werden, obwohl c-FLIP auch hier reduziert war (Abb.4.21 und 4.22). Dies zeigt, dass die Reduktion von c-FLIP nicht ausreicht, um die Zellen zu sensibilisieren, sondern dass zusätzliche Ereignisse nach HDAC-Inhibition auftreten, die ebenfalls ausschlaggebend für die Apoptose-Sensibilisierung sind.

In vorhergehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass in HPV-positiven Zellen durch HDAC-Inhibition eine ausschließlich intrinsische Apoptose induziert wird (Finzer et al., 2004). Diese Apoptose über den mitochondrialen Weg wird begleitet durch eine HPV E7-abhängige pRB-Degradation. Die pRB-Degradation wiederum führt durch Freisetzung von E2F-1 zur Induktion des pro-apoptotischen p53-Homologs p73 und schließlich zu Apoptose (Finzer et al., 2004). Interessanterweise haben Phillips et al gezeigt, dass in Osteosarkomzellen der Verlust von pRB eine Deregulation von E2F-1 verursacht, und E2F-1 durch NF- κ B-Hemmung für die TNF α -vermittelte Apoptose sensibilisiert (Phillips et al., 1999). Die von unserer Arbeitsgruppe gezeigte HPV E7-abhängige Freisetzung von E2F-1 nach HDAC-Hemmung könnte demnach für die NF- κ B-Inhibition verantwortlich sein, die allerdings, wie hier gezeigt wurde, nicht kausal für die c-FLIP-Suppression ist, aber möglicherweise ein zusätzlicher Faktor, der die Sensibilisierung gegenüber dem TNF α /TRAIL-vermittelten Zelltod ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HeLa Depletion von HPV18 mittels siRNA die NaB-induzierte Caspase 3-Aktivierung, die essentiell für die Apoptose ist, vollständig inhibieren konnte. Dies unterstützt zum einen die bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe, die eine HPV E7-abhängige Induktion der intrinsischen Apoptose beschreiben. Zum anderen konnte bei ausgeschaltetem HPV18 auch bei der kombinierten NaB/TNF α -Behandlung die Caspase 3-Aktivierung stark inhibiert werden, was darauf hinweist, dass die Apoptose-Sensibilisierung von HPV abhängig ist.

Interessanterweise ließ sich in HeLa Zellen durch die kombinierte NaB/TNF α -Behandlung eine starke Reduktion des E7-Proteins feststellen, während die alleinige Behandlung mit NaB oder TNF α keinerlei Einfluss auf E7 hatte. Ob diese Reduktion auf mRNA oder Proteinebene stattfand, muss noch untersucht werden. Das Verschwinden des E7-Proteins spricht nicht zwangsläufig gegen die Abhängigkeit der Apoptose-Sensibilisierung von HPV, denn die Zugabe von TNF α erfolgt lediglich in den letzten 5 Stunden der 24-stündigen NaB-Behandlung. Ereignisse vor der TNF α Zugabe könnten die HPV-Abhängigkeit vermitteln, wie z.B. die Degradation von pRB, die 16 h nach NaB-Behandlung beginnt (Finzer et al., 2004). Es bleibt jedoch noch zu untersuchen, ob die HPV-Abhängigkeit der NaB-induzierten Apoptose-Sensibilisierung über die E7-abhängige pRB-Degradation vermittelt wird und ob dieser Effekt über die Inhibition von NF- κ B ausgeübt oder unabhängig

davon stattfindet. Für diese Untersuchungen stellen unter anderem die NaB^R HeLa Klone ein gutes System dar.

Da die erworbene Resistenz gegenüber Apoptose ein sehr wichtiges Merkmal von Krebszellen ist, scheinen Substanzen wie HDAC-Inhibitoren vielversprechende Krebstherapeutika darzustellen. Sie können direkt eingesetzt werden, um Wachstumsarretierung und intrinsische Apoptose zu induzieren. In Kombination mit Todesliganden - rekombinant oder bereitgestellt von TAMs - weisen sie einen synergistischen Effekt auf und verringern in Tumorzellen den Schwellenwert der Apoptose um ein Vielfaches.

6. Literaturverzeichnis

1. Aguilar-Lemarroy, A., P.Gariglio, N.J.Whitaker, S.T.Eichhorst, H.H.zur, P.H.Krammer, and F.Rosl. 2002. Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* 21:165-175.
2. Ashkenazi, A. and V.M.Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
3. AUERSPERG, N. and A.P.HAWRYLUK. 1962. Chromosome observations on three epithelial-cell cultures derived from carcinomas of the human cervix. *J. Natl. Cancer Inst.* 28:605-627.
4. Bagchi, S., R.Weinmann, and P.Raychaudhuri. 1991. The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 65:1063-1072.
5. Baker, C.C., W.C.Phelps, V.Lindgren, M.J.Braun, M.A.Gonda, and P.M.Howley. 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* 61:962-971.
6. Bandara, L.R., J.P.Adamczewski, T.Hunt, and N.B.La Thangue. 1991. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* 352:249-251.
7. Blagosklonny, M.V., R.Robey, D.L.Sackett, L.Du, F.Traganos, Z.Darzynkiewicz, T.Fojo, and S.E.Bates. 2002. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* 1:937-941.
8. Bolden, J.E., M.J.Peart, and R.W.Johnstone. 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:769-784.
9. Bosch, F.X., M.M.Manos, N.Munoz, M.Sherman, A.M.Jansen, J.Peto, M.H.Schiffman, V.Moreno, R.Kurman, and K.V.Shah. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:796-802.
10. Boshart, M., L.Gissmann, H.Ikenberg, A.Kleinheinz, W.Scheurlen, and H.H.zur. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3:1151-1157.
11. Bours, V., G.Franzoso, V.Azarenko, S.Park, T.Kanno, K.Brown, and U.Siebenlist. 1993. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72:729-739.
12. Brasier, A.R., M.Lu, T.Hai, Y.Lu, and I.Boldogh. 2001. NF-kappa B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kappa B1 residence. *J. Biol. Chem.* 276:32080-32093.
13. Braun, L., M.Durst, R.Mikumo, and P.Grappuso. 1990. Differential response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus type 16-positive epithelial cells to transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* 50:7324-7332.
14. Brehm, A., E.Miska, J.Reid, A.Bannister, and T.Kouzarides. 1999. The cell cycle-regulating transcription factors E2F-RB. *Br. J. Cancer* 80 Suppl 1:38-41.

15. Brehm, A., E.A.Miska, D.J.McCance, J.L.Reid, A.J.Bannister, and T.Kouzarides. 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391:597-601.
16. Burger, R.A., B.J.Monk, T.Kurosaki, H.Anton-Culver, S.A.Vasilev, M.L.Berman, and S.P.Wilczynski. 1996. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:1361-1368.
17. Butz, K. and F.Hoppe-Seyler. 1993. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* 67:6476-6486.
18. Chang, D.W., Z.Xing, Y.Pan, A.Algeciras-Schimmich, B.C.Barnhart, S.Yaish-Ohad, M.E.Peter, and X.Yang. 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 21:3704-3714.
19. Chiang, C.M., G.Dong, T.R.Broker, and L.T.Chow. 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J. Virol.* 66:5224-5231.
20. Choi, K.H., H.Basma, J.Singh, and P.W.Cheng. 2005. Activation of CMV promoter-controlled glycosyltransferase and beta -galactosidase glycoconjugates by butyrate, trichostatin A, and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Glycoconj. J.* 22:63-69.
21. Cressman, D.E. and R.Taub. 1994. Physiologic turnover of nuclear factor kappa B by nuclear proteolysis. *J. Biol. Chem.* 269:26594-26597.
22. Cripe, T.P., T.H.Haugen, J.P.Turk, F.Tabatabai, P.G.Schmid, III, M.Durst, L.Gissmann, A.Roman, and L.P.Turek. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6:3745-3753.
23. Cronje, H.S. 2004. Screening for cervical cancer in developing countries. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 84:101-108.
24. Del Vecchio, A.M., H.Romanczuk, P.M.Howley, and C.C.Baker. 1992. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol.* 66:5949-5958.
25. Duensing, S. and K.Munger. 2003. Centrosomes, genomic instability, and cervical carcinogenesis. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 13:9-23.
26. Durst, M., A.Kleinheinz, M.Hotz, and L.Gissmann. 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 7):1515-1522.
27. Durst, M., S.Seagon, S.Wanschura, H.H.zur, and J.Bullerdiel. 1995. Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPK1A) in vitro. *Cancer Genet. Cytogenet.* 85:105-112.
28. Elbashir, S.M., J.Harborth, W.Lendeckel, A.Yalcin, K.Weber, and T.Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
29. Favre, M., G.Orth, O.Croissant, and M.Yaniv. 1975. Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72:4810-4814.
30. Feinberg, A.P. and B.Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.

31. Filippova, M., H.Song, J.L.Connolly, T.S.Dermody, and P.J.Duerksen-Hughes. 2002. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:21730-21739.
32. Finzer, P., A.Krueger, M.Stohr, D.Brenner, U.Soto, C.Kuntzen, P.H.Krammer, and F.Rosl. 2004. HDAC inhibitors trigger apoptosis in HPV-positive cells by inducing the E2F-p73 pathway. *Oncogene* 23:4807-4817.
33. Finzer, P., C.Kuntzen, U.Soto, H.H.zur, and F.Rosl. 2001. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene* 20:4768-4776.
34. Finzer, P., R.Ventz, C.Kuntzen, N.Seibert, U.Soto, and F.Rosl. 2002. Growth arrest of HPV-positive cells after histone deacetylase inhibition is independent of E6/E7 oncogene expression. *Virology* 304:265-273.
35. Franzoso, G., V.Bours, S.Park, M.Tomita-Yamaguchi, K.Kelly, and U.Siebenlist. 1992. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature* 359:339-342.
36. Freedman, R.S., J.M.Bowen, A.Leibovitz, S.Pathak, M.J.Siciliano, H.S.Gallager, and B.C.Giovanella. 1982. Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix. *In Vitro* 18:719-726.
37. Fritsche, M., C.Haessler, and G.Brandner. 1993. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8:307-318.
38. Fujita, T., G.P.Nolan, H.C.Liou, M.L.Scott, and D.Baltimore. 1993. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev.* 7:1354-1363.
39. Gallagher, S., S.E.Winston, S.A.Fuller, and J.G.Hurrell. 2004. Immunoblotting and immunodetection. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 10:Unit.
40. Ge, B., O.Li, P.Wilder, A.Rizzino, and T.W.McKeithan. 2003. NF-kappa B regulates BCL3 transcription in T lymphocytes through an intronic enhancer. *J. Immunol.* 171:4210-4218.
41. Giaccone, G., J.Battey, A.F.Gazdar, H.Oie, M.Draoui, and T.W.Moody. 1992. Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52:2732s-2736s.
42. Gissmann, L., L.Wolnik, H.Ikenberg, U.Koldovsky, H.G.Schnurch, and H.H.zur. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80:560-563.
43. Golks, A., D.Brenner, C.Fritsch, P.H.Krammer, and I.N.Lavrik. 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280:14507-14513.
44. Goodrich, D.W. and W.H.Lee. 1993. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1155:43-61.
45. Gregory, P.D., K.Wagner, and W.Horz. 2001. Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp. Cell Res.* 265:195-202.
46. Hahn, W.C. and R.A.Weinberg. 2002. Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* 347:1593-1603.
47. Hansson, M., S.Hermodsson, M.Brune, U.H.Mellqvist, P.Naredi, A.Betten, K.R.Gehlsen, and K.Hellstrand. 1999. Histamine protects T cells and natural killer cells against oxidative stress. *J. Interferon Cytokine Res.* 19:1135-1144.

48. Hardwick, J.M. 1998. Viral interference with apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:339-349.
49. Heck, D.V., C.L.Yee, P.M.Howley, and K.Munger. 1992. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:4442-4446.
50. Heldin, C.H., A.Johnsson, S.Wennergren, C.Wernstedt, C.Betsholtz, and B.Westermark. 1986. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature* 319:511-514.
51. Heller, D.S., M.Hameed, B.Cracchiolo, M.Wiederkehr, D.Scott, J.Skurnick, N.Ammar, and W.C.Lambert. 2003. Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int. J. Gynecol. Cancer* 13:67-70.
52. Hengartner, M.O. and J.A.Bryant. 2000. Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds? *Symp. Soc. Exp. Biol.* 52:1-12.
53. Hietakangas, V., M.Poukkula, K.M.Heiskanen, J.T.Karvinen, L.Sistonen, and J.E.Eriksson. 2003. Erythroid differentiation sensitizes K562 leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by downregulation of c-FLIP. *Mol. Cell Biol.* 23:1278-1291.
54. Hoppe-Seyler, F. and K.Butz. 1994. Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription. *Mol. Carcinog.* 10:134-141.
55. Iftner, T., M.Oft, S.Bohm, S.P.Wilczynski, and H.Pfister. 1992. Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. *J. Virol.* 66:4639-4646.
56. Igney, F.H. and P.H.Krammer. 2002a. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2:277-288.
57. Igney, F.H. and P.H.Krammer. 2002b. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol.* 71:907-920.
58. Kabsch, K. and A.Alonso. 2002. The human papillomavirus type 16 (HPV-16) E5 protein sensitizes human keratinocytes to apoptosis induced by osmotic stress. *Oncogene* 21:947-953.
59. Karin, M. and Y.Ben Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18:621-663.
60. Karin, M., Y.Cao, F.R.Greten, and Z.W.Li. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2:301-310.
61. Katase, K., H.Teshima, Y.Hirai, and K.Hasumi. 1995. Natural history of cervical human papillomavirus lesions. *Intervirology* 38:192-194.
62. Kaufmann, S.H., S.Desnoyers, Y.Ottaviano, N.E.Davidson, and G.G.Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53:3976-3985.
63. Keogh, S.A., H.Walczak, L.Bouchier-Hayes, and S.J.Martin. 2000. Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 471:93-98.

64. Kim, Y., N.Suh, M.Sporn, and J.C.Reed. 2002. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:22320-22329.
65. Klingelhutz, A.J., S.A.Foster, and J.K.McDougall. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82.
66. Klotz, L.O., C.Pellieux, K.Briviba, C.Pierlot, J.M.Aubry, and H.Sies. 1999. Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur. J. Biochem.* 260:917-922.
67. Kouzarides, T. 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19:1176-1179.
68. Kramer, O.H., D.Baus, S.K.Knauer, S.Stein, E.Jager, R.H.Stauber, M.Grez, E.Pfitzner, and T.Heinzel. 2006. Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev.* 20:473-485.
69. Krammer, P.H. 1999. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 71:163-210.
70. Kreuz, S., D.Siegmund, P.Scheurich, and H.Wajant. 2001. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell Biol.* 21:3964-3973.
71. Krueger, A., S.Baumann, P.H.Krammer, and S.Kirchhoff. 2001a. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 21:8247-8254.
72. Krueger, A., I.Schmitz, S.Baumann, P.H.Krammer, and S.Kirchhoff. 2001b. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 276:20633-20640.
73. Kumar, A., Y.Takada, A.M.Boriek, and B.B.Aggarwal. 2004. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* 82:434-448.
74. Kyo, S., M.Inoue, N.Hayasaka, T.Inoue, M.Yutsudo, O.Tanizawa, and A.Hakura. 1994. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology* 200:130-139.
75. La Thangue, N.B. 1994. DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:443-450.
76. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
77. Leder, A., S.Orkin, and P.Leder. 1975. Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis. *Science* 190:893-894.
78. Li, W., X.Zhang, and A.F.Olumi. 2007. MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res.* 67:2247-2255.
79. Mählknecht, U. and D.Hoelzer. 2000. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol. Med.* 6:623-644.
80. Malejczyk, J., M.Malejczyk, F.Breitburd, S.Majewski, A.Schwarz, N.Expert-Besancon, S.Jablonska, G.Orth, and T.A.Luger. 1996. Progressive growth of human papillomavirus type 16-transformed keratinocytes is associated with an increased release of soluble tumour necrosis factor (TNF) receptor. *Br. J. Cancer* 74:234-239.

81. Maltzman, W. and L.Czyzyk. 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell Biol.* 4:1689-1694.
82. Marks, P.A., V.M.Richon, T.Miller, and W.K.Kelly. 2004. Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* 91:137-168.
83. May, M.J. and S.Ghosh. 1997. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.* 8:63-73.
84. Meister, G. and T.Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349.
85. Micheau, O., S.Lens, O.Gaide, K.Alevizopoulos, and J.Tschopp. 2001. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell Biol.* 21:5299-5305.
86. Minucci, S. and P.G.Pelicci. 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6:38-51.
87. Mullis, K., F.Faloona, S.Scharf, R.Saiki, G.Horn, and H.Erlich. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24:17-27.
88. Munger, K., W.C.Phelps, V.Bubb, P.M.Howley, and R.Schlegel. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63:4417-4421.
89. Panka, D.J., T.Mano, T.Suhara, K.Walsh, and J.W.Mier. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276:6893-6896.
90. Patel, D., S.M.Huang, L.A.Baglia, and D.J.McCance. 1999. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* 18:5061-5072.
91. Pei, X.F., J.M.Meck, D.Greenhalgh, and R.Schlegel. 1993. Cotransfection of HPV-18 and v-fos DNA induces tumorigenicity of primary human keratinocytes. *Virology* 196:855-860.
92. Pfister, H. and zur Hausen H. 1978. Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1. *Med. Microbiol. Immunol.* 166:13-19.
93. Phillips, A.C., M.K.Ernst, S.Bates, N.R.Rice, and K.H.Vousden. 1999. E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol. Cell* 4:771-781.
94. Pisani, P., F.Bray, and D.M.Parkin. 2002. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* 97:72-81.
95. Pollard, J.W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 4:71-78.
96. Poukkula, M., A.Kaunisto, V.Hietakangas, K.Denessiouk, T.Katajamaki, M.S.Johnson, L.Sistonen, and J.E.Eriksson. 2005. Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* 280:27345-27355.
97. Ravi, R., G.C.Bedi, L.W.Engstrom, Q.Zeng, B.Mookerjee, C.Gelinas, E.J.Fuchs, and A.Bedi. 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat. Cell Biol.* 3:409-416.

98. Ricci, M.S., Z.Jin, M.Dews, D.Yu, A.Thomas-Tikhonenko, D.T.Dicker, and W.S.El Deiry. 2004. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol. Cell Biol.* 24:8541-8555.
99. Richon, V.M., S.Emiliani, E.Verdin, Y.Webb, R.Breslow, R.A.Rifkind, and P.A.Marks. 1998. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:3003-3007.
100. Riggs, M.G., R.G.Whittaker, J.R.Neumann, and V.M.Ingram. 1977. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 268:462-464.
101. Romanczuk, H., F.Thierry, and P.M.Howley. 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* 64:2849-2859.
102. Rosl, F., B.C.Das, M.Lengert, K.Geletneky, and H.H.zur. 1997. Antioxidant-induced changes of the AP-1 transcription complex are paralleled by a selective suppression of human papillomavirus transcription. *J. Virol.* 71:362-370.
103. Roth, S.Y., J.M.Denu, and C.D.Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 70:81-120.
104. Ruiz, L., M.Nijhuis, C.Boucher, T.Puig, A.Bonjoch, J.Martinez-Picado, S.Marfil, D.de Jong, D.Burger, A.Arno, M.Balague, and B.Clotet. 1998. Efficacy of adding indinavir to previous reverse transcriptase nucleoside analogues in relation to genotypic and phenotypic resistance development in advanced HIV-1-infected patients. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 19:19-28.
105. Sambrook, J. and M.J.Gething. 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342:224-225.
106. Scaffidi, C., J.P.Medema, P.H.Krammer, and M.E.Peter. 1997. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J. Biol. Chem.* 272:26953-26958.
107. Scaffidi, C., I.Schmitz, P.H.Krammer, and M.E.Peter. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:1541-1548.
108. Scheffner, M., J.M.Huibregtse, R.D.Vierstra, and P.M.Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505.
109. Scheffner, M., B.A.Werness, J.M.Huibregtse, A.J.Levine, and P.M.Howley. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129-1136.
110. Schiffman, M.H. and L.A.Brinton. 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76:1888-1901.
111. Schlapbach, R., K.S.Spanaus, U.Malipiero, S.Lens, A.Tasinato, J.Tschopp, and A.Fontana. 2000. TGF-beta induces the expression of the FLICE-inhibitory protein and inhibits Fas-mediated apoptosis of microglia. *Eur. J. Immunol.* 30:3680-3688.
112. Schlegel, R., W.C.Phelps, Y.L.Zhang, and M.Barbosa. 1988. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J.* 7:3181-3187.
113. Schmitz, I., S.Kirchhoff, and P.H.Krammer. 2000. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:1123-1136.

114. Schneppenheim, R., U.Budde, N.Dahlmann, and P.Rautenberg. 1991. Luminography-- a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* 12:367-372.
115. Schreiber, E., P.Matthias, M.M.Muller, and W.Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17:6419.
116. Schwarz, E., U.K.Freese, L.Gissmann, W.Mayer, B.Roggenbuck, A.Stremlau, and H.H.zur. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314:111-114.
117. Skurk, C., H.Maatz, H.S.Kim, J.Yang, M.R.Abid, W.C.Aird, and K.Walsh. 2004. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J. Biol. Chem.* 279:1513-1525.
118. Smyth, M.J. and M.H.Kershaw. 2003. Discovery of an innate cancer resistance gene? *Mol. Interv.* 3:186-189.
119. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
120. Stanbridge, E.J. 1988. Genetic analysis of human malignancy using somatic cell hybrids and monochromosome transfer. *Cancer Surv.* 7:317-324.
121. Stubenrauch, F. and L.A.Laimins. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* 9:379-386.
122. Swift, F.V., K.Bhat, H.B.Youngusband, and H.Hamada. 1987. Characterization of a cell type-specific enhancer found in the human papilloma virus type 18 genome. *EMBO J.* 6:1339-1344.
123. Takada, Y., A.Gillenwater, H.Ichikawa, and B.B.Aggarwal. 2006. Suberoylanilide hydroxamic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis by suppressing nuclear factor-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 281:5612-5622.
124. Tartaglia, L.A. and D.V.Goeddel. 1992. Two TNF receptors. *Immunol. Today* 13:151-153.
125. Thompson, D.A., V.Zacny, G.S.Belinsky, M.Classon, D.L.Jones, R.Schlegel, and K.Munger. 2001. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene* 20:3629-3640.
126. Timmermann, S., H.Lehrmann, A.Poleskaya, and A.Harel-Bellan. 2001. Histone acetylation and disease. *Cell Mol. Life Sci.* 58:728-736.
127. Towbin, H., T.Staehelin, and J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:4350-4354.
128. Trauth, B.C., C.Klas, A.M.Peters, S.Matzku, P.Moller, W.Falk, K.M.Debatin, and P.H.Krammer. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245:301-305.
129. Tschopp, J., M.Irmler, and M.Thome. 1998. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr. Opin. Immunol.* 10:552-558.

130. Venturini, F., J.Braspenning, M.Homann, L.Gissmann, and G.Szczakiel. 1999. Kinetic selection of HPV 16 E6/E7-directed antisense nucleic acids: anti-proliferative effects on HPV 16-transformed cells. *Nucleic Acids Res.* 27:1585-1592.
131. von Knebel, D.M., T.Bauknecht, D.Bartsch, and H.H.zur. 1991. Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulating papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:1411-1415.
132. von Knebel, D.M., C.Rittmuller, H.H.zur, and M.Durst. 1992. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int. J. Cancer* 51:831-834.
133. Walczak, H., R.E.Miller, K.Ariail, B.Gliniak, T.S.Griffith, M.Kubin, W.Chin, J.Jones, A.Woodward, T.Le, C.Smith, P.Smolak, R.G.Goodwin, C.T.Rauch, J.C.Schuh, and D.H.Lynch. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5:157-163.
134. Wang, C.Y., J.C.Cusack, Jr., R.Liu, and A.S.Baldwin, Jr. 1999. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat. Med.* 5:412-417.
135. Wang, C.Y., M.W.Mayo, and A.S.Baldwin, Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274:784-787.
136. Watanabe, S., T.Kanda, and K.Yoshiike. 1993. Growth dependence of human papillomavirus 16 DNA-positive cervical cancer cell lines and human papillomavirus 16-transformed human and rat cells on the viral oncoproteins. *Jpn. J. Cancer Res.* 84:1043-1049.
137. Wolffe, A.P., F.D.Urnov, and D.Guschin. 2000. Co-repressor complexes and remodelling chromatin for repression. *Biochem. Soc. Trans.* 28:379-386.
138. Woodworth, C.D., V.Notario, and J.A.DiPaolo. 1990. Transforming growth factors beta 1 and 2 transcriptionally regulate human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression in HPV-immortalized human genital epithelial cells. *J. Virol.* 64:4767-4775.
139. Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
140. Yee, C., I.Krishnan-Hewlett, C.C.Baker, R.Schlegel, and P.M.Howley. 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* 119:361-366.
141. Yeh, J.H., S.C.Hsu, S.H.Han, and M.Z.Lai. 1998. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J. Exp. Med.* 188:1795-1802.
142. Yoshida, M., M.Kijima, M.Akita, and T.Beppu. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265:17174-17179.
143. Zandi, E. and M.Karin. 1999. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I kappa B kinase complex. *Mol. Cell Biol.* 19:4547-4551.
144. Zhang, Q., J.A.Didonato, M.Karin, and T.W.McKeithan. 1994. BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins. *Mol. Cell Biol.* 14:3915-3926.

-
145. zur Hausen H. 1991. Viruses in human cancers. *Science* 254:1167-1173.
 146. zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288:F55-F78.
 147. zur Hausen H. and F.Rosl. 1994. Pathogenesis of cancer of the cervix. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59:623-628.
 148. zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.1.1	Abbildung (Kapitel 1. Abbildung 1)
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BPV	Bovines Papilloma Virus
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c-FLIP	cellular-FLICE inhibitory protein
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
h	Stunde
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
mA	Milliampere
µg	Mikrogramm
kDa	Kilodalton
min	Minute
M	molar
µM	Mikromolar
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PVDF	Polyvinylidonfluorid
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tab.1.1	Tabelle (Kapitel 1. Abbildung 1)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan monolaurat
U	Units
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v-FLIP	viral-FLICE inhibitory protein
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Frank Rösl für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas, und für sein stetes Interesse an dem Fortschreiten des Projektes bedanken. Neben den vielen hilfreichen Diskussionen und Ideen seinerseits, ohne die diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden wäre, gab er mir stets die Gelegenheit meine eigenen Vorstellungen umzusetzen. Für diese Freiheiten bin ich sehr dankbar.

Herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. Rainer Zawatzky und Priv.-Doz. Dr. Dieter Kübler für ihre freundliche Übernahme der Vertretung der Arbeit als Gutachter vor der Fakultät für Biowissenschaften der Universität Heidelberg.

Zusätzlich möchte ich mich bei Monika Stöhr für die technischen Hilfestellungen herzlich bedanken. Dirk Brenner und Cornelius Fritsch von der Abteilung Immungenetik danke ich für die Präparation der Makrophagen und die ständige Versorgung mit NF6 Antikörper.

Mein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskollegen der Arbeitsgruppe Virale Transformationsmechanismen, nicht nur für die wissenschaftlich anregende Atmosphäre in den Seminaren und stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sondern auch für die familiäre und freundschaftliche Stimmung sowohl während der Arbeit, als auch in der Freizeit.

7.3 Veröffentlichung von Teilergebnissen der Dissertation

Tagungsbeiträge:

9 th DKFZ PhD Retreat 2006, Weil der Stadt

Poster: Darvas K.; Finzer P.; Fritsch C.; Krammer P. H. and Rösl F.

HDAC inhibitor-induced sensitization of HPV-positive cervical carcinoma cell lines to TNF α -mediated cell death

3rd International PhD Student Symposium 2006, Göttingen

Poster: Darvas K.; Finzer P.; Fritsch C.; Krammer P. H. and Rösl F.

HDAC inhibitor-induced sensitization of HPV-positive cervical carcinoma cell lines to TNF α -mediated cell death

DKFZ PhD Poster Presentation, 2006, Heidelberg

Poster: Darvas K.; Finzer P.; Fritsch C.; Krammer P. H. and Rösl F.

HDAC inhibitor-induced sensitization of HPV-positive cervical carcinoma cell lines to TNF α -mediated cell death

24th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop 2007, Beijing

Präsentation und Poster: Darvas K.; Brenner D.; Krammer P. H. and Rösl F.

Sensitization of HPV-positive cervical carcinoma cells to TRAIL- and TNF α -mediated apoptosis