

**Die Serin-Protease HtrA1 ist ein neuer Regulator der
Zellteilung und spielt eine wichtige Rolle bei der
malignen Transformation**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Nina Schmidt

aus Castrop-Rauxel

Februar 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Michael Ehrmann

2. Gutachter: Prof. Shirley Knauer

3. Gutachter: ---

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Hemmo Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2010

Teile dieser Dissertation sind in folgenden Publikationen enthalten:

Anna Severino, Mara Campioni, Stefania Straino, Fadi N. Salloum, **Nina Schmidt**, Ulrike Herbrand, Stilla Frede, Gabriele Toietta, Giuliana Di Rocco, Rossana Bussani, Furio Silvestri, Maddalena Piro, Giovanna Liuzzo, Luigi M. Biasucci, Pasquale Mellone, Florinda Feroce, Maurizio Capogrossi, Feliciano Baldi, Joachim Fandrey, Michael Ehrmann, Filippo Crea, Antonio Abbate, Alfonso Baldi
„Identification of Protein Disulfide Isomerase as a Cardiomyocyte Survival Factor in Ischemic Cardiomyopathy“; Journal of the American College of Cardiology, 2007 vol. 50 (11) pp. 1029-1037

Tennstaedt, A., Truebestein, L., Hauske, P., **Schmidt, N.**, Irle, I., Kaiser, M., Brandt, R., Sickmann, A., Egensperger, R., Baldi, A., Dehmelt, L. und Ehrmann M.
„HtrA1 is a tau protease“ (eingereicht bei Neurology, Januar 2010)

Nina Schmidt*, Inga Irle*, Annette Tennstaedt, Christian Johannes, Lee Parry, Kirsty Greenow, Sarah Amir, Alan Clarke, Mara Campioni, Alfonso Baldi, Urs Lewandrowski, Albert Sickmann, Jeremy Chien, Viji Shridhar, Chio Oka, Masashi Kawaichi, Tad Holak, Adrian Bird, Tim Clausen, and Michael Ehrmann

*beide Autoren haben gleichen Anteil an der Publikation

„Implications of HtrA1 in cell division and its epigenetic control during tumorigenesis“ (in Vorbereitung)

Inhalt

Inhalt.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	10
Danksagung.....	11
1 Einleitung.....	12
1.1 Maligne Transformation.....	12
1.1.1 Unabhängigkeit von Wachstumssignalen.....	13
1.1.2 Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumssignalen.....	14
1.1.3 Vermeidung von Apoptose.....	15
1.1.4 Unbegrenztetes Replikationspotential.....	15
1.1.5 Fortwährende Angiogenese.....	16
1.1.6 Gewebeinvasion und Metastasierung.....	17
1.1.7 Genomische Instabilität.....	17
1.2 Der Zellzyklus.....	18
1.2.1 Cycline, CDKs und CDKI.....	19
1.2.2 G ₁ -Progression.....	20
1.2.3 S-Phase.....	21
1.2.4 G ₂ -Phase.....	21
1.2.5 G ₂ /M-Übergang.....	23
1.2.6 Mitose (M-Phase).....	23
1.2.7 Cytokinese.....	24
1.2.8 Centrosomen.....	25
1.3 Die Familie der HtrA-Serin-Proteasen.....	27
1.3.1 HtrA1.....	29
1.3.2 HtrA2.....	30
1.3.3 HtrA3.....	31
2 Zielsetzung der Arbeit.....	32
3 Material und Methoden.....	33
3.1 Material.....	33
3.1.1 Bakterienstämme.....	33
3.1.2 Nährmedien und Antibiotika.....	33
3.1.2.1 Nährmedien.....	33
3.1.2.2 Antibiotika.....	33
3.1.3 Eukaryotische Zelllinien.....	33
3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze.....	34
3.1.5 Puffer und Lösungen.....	35
3.1.6 Antikörper.....	36
3.1.6.1 Primärantikörper.....	36
3.1.6.2 Sekundärantikörper.....	36
3.1.7 Biochemikalien und Chemikalien.....	37
3.1.7.1 Proteine und Enzyme.....	37
3.1.7.2 Protein- und Nukleinsäurestandards.....	37
3.1.7.3 Chemikalien.....	37
3.1.8 Plasmide.....	38
3.1.9 Oligonukleotide.....	39
3.1.10 Kit-Systeme.....	40
3.1.11 Verbrauchsmaterial.....	40

3.1.12	Geräte	40
3.1.13	Computersoftware	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Zellbiologische Methoden	42
3.2.1.1	Zellhaltung	42
3.2.1.2	Zellen auftauen	42
3.2.1.3	Anlage von Gefrierkulturen	42
3.2.1.4	Zellpassage	42
3.2.1.5	Gewebekultur von primären embryonalen Mausfibroblasten (MEF)	42
3.2.1.6	Behandlung mit Chemikalien	43
3.2.1.7	Zellen synchronisieren	43
3.2.1.7.1	Synchronisation des Zellzyklus durch Behandlung mit Aphidicolin 43	
3.2.1.7.2	Doppel-Thymidin-Block	43
3.2.1.8	stabile Transduktion	43
3.2.1.9	Selektionierung	44
3.2.1.10	Wachstumskurve	44
3.2.1.11	2D-Migrationsassay	45
3.2.1.12	Bestimmung der Chromosomenzahl (Karyotypisierung)	45
3.2.2	Protein-biochemische Methoden	45
3.2.2.1	Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer (FACS)	45
3.2.2.2	Gleichzeitige Zellzyklusanalyse und intrazelluläre Antikörper-Färbung mit dem Durchflusszytometer	45
3.2.2.3	Intrazelluläre Immunfluoreszenz mit dem Durchflusszytometer	46
3.2.2.4	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen	46
3.2.2.5	Bradford	47
3.2.2.6	Herstellung cytoplasmatischer Proteinlysate	47
3.2.2.7	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	47
3.2.2.8	Immunoblot und Detektion	47
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	48
3.2.3.1	cDNA-Synthese	48
3.2.3.2	qRT-PCR	48
3.2.3.2.1	Quantitative Real-Time PCR (QPCR)	48
3.2.3.2.2	Durchführung der quantitativen Real Time-PCR	50
3.2.3.3	qRT-PCR-Primer	50
3.2.3.4	cDNA-Microarray	50
3.2.3.5	Sequenzierung	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Untersuchung der Expression der HtrA-Proteine	52
4.1.1	Primäre embryonale Mausfibroblasten	52
4.1.2	Kolonkarzinomzelllinie SW480	54
4.2	HtrA1 ist extrazellulär und intrazellulär lokalisiert	56
4.3	Konsequenzen des knockouts von HtrA1 in primären embryonalen Mausfibroblasten	57
4.3.1	Einfluss auf den DNA-Gehalt	58
4.3.2	Spindelanomalien	59
4.3.3	Numerische Abberation der Centrosomen	60
4.3.4	Einfluss auf das Proliferationsverhalten	62
4.3.5	Einfluss auf das Migrationsverhalten	63
4.3.6	Einfluss auf die Zellgröße	64

4.4	Konsequenzen des knock downs von HtrA1 in der Kolonkarzinomzelllinie SW480	66
4.4.1	Einfluss auf den DNA-Gehalt.....	66
4.4.2	Polyploidie in Abhängigkeit von der Zelldichte	67
4.4.3	Einfluss auf die Expression von p21, p53 und Mdm2.....	68
4.5	Die HtrA1-Expression verändert sich zellzyklusabhängig.....	70
4.5.1	Primäre embryonale Mausfibroblasten.....	70
4.5.2	Kolonkarzinomzelllinie SW480	72
4.6	Mögliche Regulationswege von HtrA1	74
4.6.1	Suche nach Bedingungen unter denen HtrA1 unterschiedlich reguliert ist 74	
4.6.2	cDNA-Microarray	77
4.6.3	Validierung von Treffern	81
5	Diskussion	85
5.1	Expression der HtrA-Proteine	85
5.2	Eine verminderte HtrA1-Expression begünstigt die Transformation von normalen Zellen zu Tumorzellen.....	87
5.3	Die durch den HtrA1-Verlust ausgelöste Polyploidie in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 ist abhängig von der Zelldichte.....	91
5.4	Modell für die Regulation des p53-Signalwegs durch HtrA1.....	91
5.5	Die HtrA1-Proteinmenge wird zellzyklusabhängig reguliert.....	93
5.6	Mögliche Regulationswege von HtrA1	94
6	Zusammenfassung und Ausblick	96
6.1	Zusammenfassung	96
6.2	Ausblick.....	97
7	Literaturverzeichnis	99
	Erklärungen	113
	Lebenslauf.....	114

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
°C	Grad Celsius
γ-TuRC	γ-Tubulin-Ring-Komplex
µl	10 ⁻⁶ L
µm	10 ⁻⁶ m
Abb.	Abbildung
ActD	Actinomycin D
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
APC	<i>Anaphase promoting complex</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
bp	Basenpaare
BrefA	Brefeldin A
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>Cyclin dependent kinase</i>)
CDKI	CDK-Inhibitor
CIP/KIP	CDK-interagierendes Protein/Kinase-Inhibitor-Protein
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
fl	Femtoliter (10 ⁻¹² L)
for	<i>forward</i>
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HtrA	<i>High Temperature Requirement Factor A</i>
IAP	Apoptose-Inhibitorprotein
IBM	IAP-bindendes Motiv
IGFBP	<i>Insuline-like growth factor binding protein</i>
INK4	Inhibitor von CDK4
kD	Kilodalton
KI	Kazal-ähnliche Inhibitor-Domäne
L	Liter
LV	Leervektor
m	Meter
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
Mdm2	<i>murine double minute 2</i>
MEF	Embryonale Mausfibroblasten (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
min	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
MLS	mitochondriales Lokalisationssignal
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
nt	Nukleotide
PAR	Poly-ADP-Ribosylierung
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCM	pericentriolare Matrix
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serin
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SS	Signalsequenz
SV40	Simian-Virus 40
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
Thr	Threonin
TM	Transmembrandomäne
Tyr	Tyrosin
UK	Vereinigtes Königreich (<i>United Kingdom</i>)
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1-1 MODEL DER KLONALEN TUMORENTSTEHUNG	12
ABB. 1-2 DER EUKARYOTISCHE ZELLZYKLUS.....	18
ABB. 1-3 REGULATION DER P53-AKTIVITÄT DURCH MDM2.	22
ABB. 1-4 ABLAUF DER CENTROSOMEN-VERDOPPLUNG WÄHREND DES ZELLZYKLUS.....	25
ABB. 1-5 DIE PROTEINE DER HTRA-FAMILIE.....	28
ABB. 4-1 RNA-EXPRESSION VON HTRA1 IN HTRA1-WILDTYP- UND HTRA1-KNOCKOUT-FIBROBLASTEN	52
ABB. 4-2 PROTEINEXPRESSION VON HTRA1 IN HTRA1-WILDTYP- UND HTRA1-KNOCKOUT-FIBROBLASTEN ...	53
ABB. 4-3 RNA-EXPRESSION VON HTRA2 UND HTRA3 IN HTRA1-WILDTYP- UND HTRA1-KNOCKOUT-FIBROBLASTEN.....	53
ABB. 4-4 RNA-EXPRESSION VON HTRA1 IN SW480-ZELLINIEN	54
ABB. 4-5 PROTEIN-EXPRESSION VON HTRA1 IN SW480-ZELLINIEN.....	55
ABB. 4-6 HTRA2- UND HTRA3-RNA-EXPRESSION IN SW480.....	56
ABB. 4-7 LOKALISATION VON HTRA1 IN DER ÜBEREXPRESSIONSZELLINIE SW480 P50HTRA1.....	57
ABB. 4-8 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTS IN PRIMÄREN MAUSFIBROBLASTEN	58
ABB. 4-9 BESTIMMUNG DER CHROMOSOMENZAHL DER MAUSFIBROBLASTENLINIEN IN 50 AUSGEWÄHLTEN MITOSEN	58
ABB. 4-10 SPINDELFÄRBUNGEN.....	59
ABB. 4-11 AUSZÄHLUNG DER ANZAHL DER ZELLEN MIT BIPOLAREN UND MULTIPOLAREN SPINDELN.....	60
ABB. 4-12 CENTROSOMENFÄRBUNG	61
ABB. 4-13 CENTROSOMENANZAHL IN 50 MITOSEN DER HTRA1-WILDTYP- UND HTRA1-KNOCKOUT-FIBROBLASTENLINIEN	62
ABB. 4-14 WACHSTUMSKURVEN DER FIBROBLASTENLINIEN 288(1) HTRA1+/+ UND 145(2) HTRA1-/-.....	63
ABB. 4-15 MIGRATIONSVERHALTEN DER FIBROBLASTENLINIEN 288(1) HTRA1+/+, 145(2) HTRA1-/- UND 145(3) HTRA1-/-	64
ABB. 4-16 VERGLEICH DES MITTLEREN DURCHMESSERS UND DES MITTLEREN VOLUMENS DER FIBROBLASTENLINIEN 288(1) HTRA1+/+ UND 145(2) HTRA1-/-	65
ABB. 4-17 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DES DNA-GEHALTS DER BEIDEN ZELLINIEN SW480 PLK0LV UND SW480 SHHTRA1 D3	66
ABB. 4-18 BESTIMMUNG DER CHROMOSOMENZAHL DER SW480-ZELLINIEN IN 50 AUSGEWÄHLTEN MITOSEN	67
ABB. 4-19 EINFLUSS DER KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN AUF DEN DNA-GEHALT.....	68
ABB. 4-20 P21-, P53- UND MDM2-RNA-EXPRESSION IN SW480-ZELLINIEN.....	69
ABB. 4-21 P53- UND MDM2-EXPRESSION IN SW480-ZELLINIEN	70
ABB. 4-22 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER HTRA1-PROTEIN-EXPRESSION IN MEF IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZELLZYKLUS.....	71
ABB. 4-23 RNA-EXPRESSION VON HTRA1 IN MEF IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZELLZYKLUS	72
ABB. 4-24 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER HTRA1-PROTEIN-EXPRESSION IN SW480 PARENTAL IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZELLZYKLUS.....	73
ABB. 4-25 RNA-EXPRESSION VON HTRA1 IN SW480 PARENTAL IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZELLZYKLUS.....	73
ABB. 4-26 AUSWIRKUNGEN DER ACTINOMYCIN D-BEHANDLUNG AUF DIE HTRA1-EXPRESSION IN SW480-ZELLEN.....	75
ABB. 4-27 AUSWIRKUNGEN DER ACTINOMYCIN D-BEHANDLUNG AUF DIE HTRA1-EXPRESSION IN U373-ZELLEN.....	76
ABB. 4-28 AUSWIRKUNGEN DER BREFELDIN A-BEHANDLUNG AUF DIE HTRA1-EXPRESSION IN SW480-ZELLEN.....	76
ABB. 4-29 AUSWIRKUNGEN DER BREFELDIN A-BEHANDLUNG AUF DIE HTRA1-EXPRESSION IN U373-ZELLEN	77
ABB. 4-30 CYCLIN D ₁ -EXPRESSION NACH BEHANDLUNG MIT BREFELDIN A ODER ACTINOMYCIN D IN SW480-ZELLEN.....	82
ABB. 4-31 CYCLIN D ₁ -EXPRESSION NACH BREFELDIN A- ODER ACTINOMYCIN D-BEHANDLUNG IN U373-ZELLEN.....	82
ABB. 4-32 IGFBP2-EXPRESSION NACH BREFELDIN A- ODER ACTINOMYCIN D-BEHANDLUNG IN SW480.....	83
ABB. 4-33 IGFBP2-EXPRESSION NACH BREFELDIN A- ODER ACTINOMYCIN D-BEHANDLUNG IN U373.....	84
ABB. 5-1 MODELL FÜR DIE REGULATION DES P53-SIGNALWEGS DURCH HTRA1	92

Tabellenverzeichnis

TABELLE 3-1 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME.....	33
TABELLE 3-2 VERWENDETE EUKARYOTISCHE ZELLINIEN.....	33
TABELLE 3-3 LISTE DER VERWENDETEN PRIMÄRANTIKÖRPER.....	36
TABELLE 3-4 LISTE DER VERWENDETEN SEKUNDÄRANTIKÖRPER.....	36
TABELLE 3-5 LISTE DER VERWENDETEN PLASMIDE.....	38
TABELLE 3-6 LISTE DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE.....	39
TABELLE 4-1 GENE, DIE EINE ROLLE BEI DER REGULATION VON ZELLZYKLUS UND PROLIFERATION SPIELEN UND ÄHNLICH WIE HTRA1 REGULIERT SIND.....	78
TABELLE 4-2 GENE, DIE EINE ROLLE BEIM AUFBAU DES ZYTOSKELETTS SPIELEN UND ÄHNLICH WIE HTRA1 REGULIERT SIND.....	79
TABELLE 4-3 GENE, DIE UNTER DEN VERWENDETEN BEDINGUNGEN ÄHNLICH WIE HTRA1 REGULIERT SIND....	80
TABELLE 4-4 GENE, DIE UNTER DEN VERWENDETEN BEDINGUNGEN GEGENSÄTZLICH ZU HTRA1 REGULIERT SIND.....	80
TABELLE 4-5 VERGLEICH DER LOG ₂ RATIOS FÜR IGFBP2 UND CYCLIN D ₁ (CCND1) IN ARRAY UND QRT- PCR.....	84

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Michael Ehrmann für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Die zahlreichen kritischen und konstruktiven Diskussionen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Helmut Tourné möchte ich für die hervorragende technische Unterstützung in der Zellkultur und bei der Probenvorbereitung danken. Ohne seine Hilfe wären einige Experimente nur schwer möglich gewesen.

Adam Zawistowski danke ich vor allem für die moralische Unterstützung bei der ein oder anderen Nachtschicht sowie die praktischen Kleinigkeiten und Dienstbotengänge, die den Arbeitsalltag in der Zellkultur um Einiges leichter gemacht haben.

Annette Tennstädt und Inga Irle danke ich besonders für die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen, die aufmunternden und aufbauenden Worte und die moralische Unterstützung bei den kleinen und großen Problemen im Laboralltag.

Bei allen anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die schöne Zeit, die wir zusammen hatten sowie für all die lustigen und ernsthaften Gespräche. Ich werde euch vermissen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Schwiegereltern für die großartige Unterstützung während der letzten Jahre.

Zum guten Schluss möchte ich mich bei meinem Mann Burkhard Schmidt für die unendliche Geduld, den Zuspruch und die liebevolle Unterstützung bedanken.

1 Einleitung

1.1 Maligne Transformation

Die Tumorentstehung beginnt mit einem initialen Ereignis in einer einzelnen Zelle, welches dieser Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen verschafft. Innerhalb der Kontrollmechanismen des Organismus kann die Zelle zu einem Klon identischer Zellen heranwachsen. Durch ein weiteres Ereignis, z. B. eine Mutation, in einer Zelle dieses Klons ergibt sich für diese wiederum ein Wachstumsvorteil. Diese Sequenz wiederholt sich, bis sich der entstehende Klon den Kontrollmechanismen des Organismus entziehen kann und zu einem Tumor heranwächst.

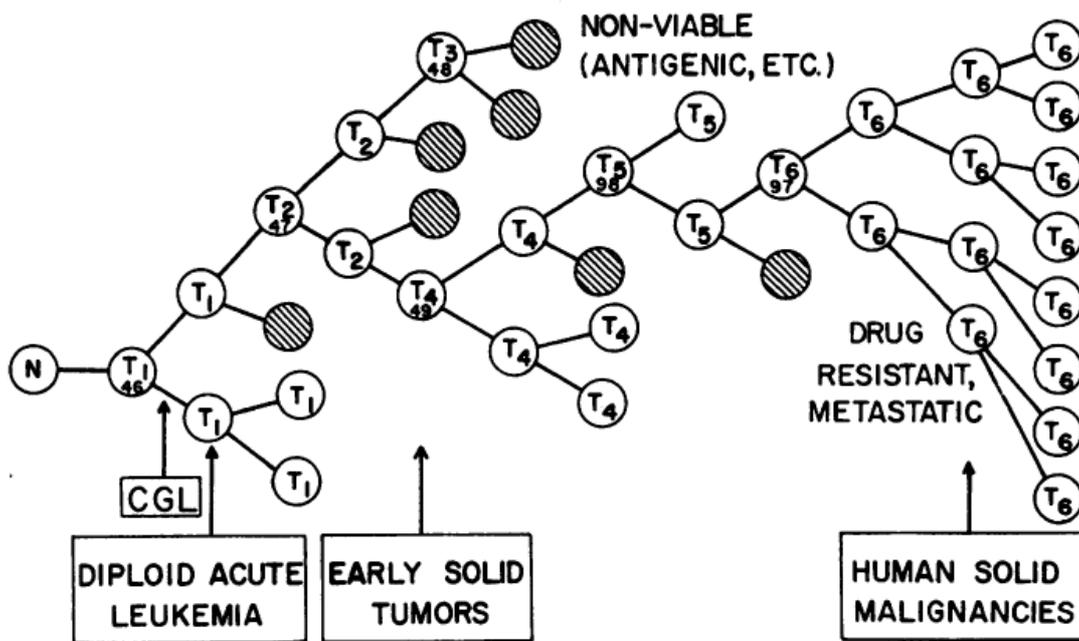


Abb. 1-1 Modell der klonalen Tumorentstehung

Karzinogen-induzierte Änderungen in einer normalen Vorläuferzelle (N) führen zu einer diploiden Tumorzelle (T1, 46 Chromosomen). Deren Wachstumsvorteile erlauben den Beginn der klonalen Expansion. Genetische Instabilität in T1 führt zur Entstehung von Varianten (T2 bis T6 mit unterschiedlicher Chromosomenzahl). Die meisten der Varianten gehen aufgrund von metabolischen oder immunologischen Nachteilen zu Grunde (schraffierte Kreise). Zufällig kann aber eine der Varianten einen weiteren Wachstumsvorteil erhalten. Die Nachkommen dieser Zelle bilden die dominierende Subpopulation bis eine weitere Zelle einen Wachstumsvorteil erhält. Diese schrittweise Abfolge variiert von Tumor zu Tumor und führt zu verschiedenen aneuploiden Karyotypen in jedem voll entwickelten malignen Tumor (T6). Humane Tumore mit minimalen chromosomalen Veränderungen (z.B. diploide akute Leukämie) entstehen wahrscheinlich früh während der klonalen Evolution, humane solide Tumore dagegen, die typischerweise hoch aneuploid sind, entstehen erst im späteren Verlauf der klonalen Entwicklung (Nowell, 1976).

Dies bedeutet, dass Tumore klonalen Ursprungs sind, da sie aus einer einzigen nor-

malen Zelle entstehen können (Nowell 1976). Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Entsteht dabei ein bösartiger Tumor, der durch Invasion in benachbartes Gewebe und Metastasierung in entfernt liegendes Gewebe charakterisiert ist, so spricht man von maligner Transformation.

Auch die Transformation kultivierter Zellen ist ein mehrstufiger Prozess. Nagerzellen benötigen dabei mindesten zwei induzierte genetische Veränderungen bevor sie tumorigen werden. Humane Zellen sind schwieriger zu transformieren (Hahn et al., 1999) Dies alles zusammen deutet darauf hin, dass die Tumorentwicklung der Darwin'schen Evolution ähnelt. Dabei führt eine Abfolge von genetischen Veränderungen, welche jeweils einen Wachstumsvorteil bieten, zu einer progressiven Umwandlung von normalen Zellen in Krebszellen (Foulds, 1954; Nowell, 1976; Stoler et al., 1999).

Die maligne Transformation wird durch verschiedene Eigenschaften, die die Zelle durch genetische Veränderungen erwirbt, charakterisiert. Dies sind vor allem die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, die Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumssignalen, die Vermeidung von Apoptose, eine fortwährende Neoangiogenese sowie die Gewebeinvasion und Metastasierung. Ein zusätzliches Charakteristikum ist die genomische Instabilität (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese Eigenschaften sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

1.1.1 Unabhängigkeit von Wachstumssignalen

Um vom ruhenden Status in den aktiven proliferierenden Status zu wechseln, benötigen normale Zellen mitogene Wachstumssignale. Diese Signale werden über Transmembranrezeptoren vermittelt, die bestimmte Klassen von Signalmolekülen binden. Dazu gehören lösliche Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix sowie Zell-Zell-Adhäsions und -Interaktions-Moleküle. Nach heutigem Wissen können normale Zellen in Abwesenheit dieser Signale nicht proliferieren. Das Umgehen der Abhängigkeit von solchen exogen erhaltenen Signalen zerstört einen kritischen homöostatischen Mechanismus, der normalerweise die richtige Funktionsweise und das Zusammenspiel der verschiedenen Zellarten in einem Gewebe sicherstellt (Hanahan and Weinberg, Cell 2000). Bisher sind drei molekulare Strategien bekannt, die eine Autonomie der Zellen gegenüber Wachstumsfaktoren ermöglichen. Die meisten mitogenen Wachstumsfaktoren werden von einem Zelltyp produziert, um andere Zelltypen zu stimulieren. Dies nennt man heterotypische Signalwege. Viele Krebszellen sind aber dazu in der Lage die nötigen Wachstumsfaktoren selbst zu

produzieren, wodurch sie eine positive Rückkopplungsschleife bilden, die autokrine Stimulation genannt wird. Die zweite Strategie involviert Zelloberflächen-Rezeptoren, die die Wachstumssignale in das Zellinnere weiterleiten. Diese werden in Krebszellen oft überexprimiert, wodurch die Zellen hypersensitiv für bestimmte Wachstumsfaktoren werden (Fedi et al 1997). Eine sehr große Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren kann außerdem zu einer Liganden-unabhängigen Weiterleitung von Signalen führen (DiFiore et al. 1987). Eine Liganden-unabhängige Weiterleitung von Signalen kann aber auch durch eine strukturelle Veränderung der beteiligten Proteine, wie z.B. Trunkierung, verursacht werden (Fedi et al. 1997). Der dritte Mechanismus beinhaltet eine Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen durch Veränderungen bestimmter Komponenten. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die SOS-Ras-Raf-MAPK-Kaskade. In etwa 25% aller humanen Tumore ist das Ras-Protein strukturell verändert und vermittelt dadurch mitogene Signale in der Zelle ohne eine vorhergehende Stimulation der regulierenden Rezeptoren (Medema und Bos 1993).

1.1.2 Insensitivität gegenüber Anti-Wachstumssignalen

In einem normalen Gewebe werden der zelluläre Ruhestatus und die Gewebemöostase durch verschiedene antiproliferative Signale aufrecht erhalten. Diese Signale beinhalten sowohl lösliche Wachstumsinhibitoren als auch in die extrazelluläre Matrix eingebettete oder auf benachbarten Zellen immobilisierte Inhibitoren. Diese wachstumsinhibierenden Signale werden ebenfalls über Transmembran-Rezeptoren an intrazelluläre Signalwege weitergegeben (Hanahan und Weinberg, 2000). Auf molekularer Ebene werden viele, wenn nicht alle antiproliferativen Signale über das Retinoblastom-Protein (pRb) und die beiden verwandten p107 und p130 geschleust (Weinberg 1995). Eine Störung des pRb-Signalwegs befreit E2F-Transkriptionsfaktoren und ermöglicht dadurch die Zellproliferation (vgl. 1.2.2). Dadurch werden Zellen gegenüber wachstumsinhibierenden Faktoren insensitiv, die normalerweise über diesen Signalweg das Voranschreiten der G₁-Phase inhibieren. Einer der wichtigsten Faktoren, der über den pRb-Signalweg arbeitet, ist TGFβ. TGFβ verhindert die inaktivierende Phosphorylierung von pRb über verschiedene Wege. Unter anderem stimuliert es die Synthese von p15^{INK4B} und p21, welche den Cyclin-CDK-Komplex, der für die Phosphorylierung von pRb verantwortlich ist, blockieren (vgl.1.2.1 und 1.2.2) (Hannon und Beach 1994; Datto et al. 1997). Der pRb-Signalweg kann über verschiedene Wege gestört werden. In einigen Tumoren wird die TGFβ-Rezeptor-Expression herunterreguliert, während andere Tumore eine

nichtfunktionale Rezeptorform exprimieren (Fynan und Reiss 1993; Markowitz et al. 1995). Außerdem ist auch das pRb-Protein selbst häufig von Mutationen betroffen, die die Funktion zerstören (Dyson et al. 1989; Cordon-Cardo, 1995).

1.1.3 Vermeidung von Apoptose

Die Fähigkeit von Tumorzellpopulationen die Anzahl der beteiligten Zellen zu vermehren ist nicht nur von der Proliferationsrate abhängig, sondern auch von der Menge des Zellverlusts. Dieser Verlust wird vor allem durch den programmierten Zelltod, die Apoptose, verursacht. Es mehren sich die Beweise dafür, dass die erworbene Resistenz gegenüber der Apoptose bzw. Apoptose-auslösenden Faktoren ein wichtiges Kennzeichen in vielen oder sogar allen Krebsarten ist (Hanahan and Weinberg, Cell 2000).

Die Resistenz gegenüber der Apoptose kann von Tumorzellen auf verschiedenen Wegen erworben werden. Der am häufigsten vorkommende Verlust eines proapoptischen Regulators durch Mutation involviert das p53-Tumorsuppressorgen. Die daraus folgende funktionelle Inaktivierung des p53-Proteins kommt in mehr als 50% aller humanen Tumore vor. Dadurch wird ein Schlüsselement des Mechanismus zur Erkennung von DNA-Schäden und der folgenden Aktivierung der apoptotischen Effektor-Kaskade entfernt (Harris, 1996). Auch viele andere Signalwege, wie z.B. der PI3-Kinase-Akt/PKB-Signalweg, können betroffen sein. Es wird vermutet, dass jede Krebszelle in der Lage ist die Apoptose zu umgehen (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.1.4 Unbegrenzt Replikationspotential

Viele Zelltypen beinhalten ein intrinsisches, zellautonomes Programm, das eine unbegrenzte Vermehrung verhindert. Es funktioniert unabhängig von den bisher beschriebenen Zellsignalwegen und muss ebenfalls gestört werden, damit ein Zellklon zu einem makroskopischen Tumor heranwachsen kann (Hanahan und Weinberg, 2000).

Kultivierte Zellen haben ein endliches Replikationspotential (Hayflick 1997). Nach einer bestimmten Anzahl von Zellverdopplungen hören diese Zellen auf zu wachsen, sie werden seneszent. Wird die Seneszenz durch Ausschalten der beiden Tumorsuppressorgene pRb und p53 umgangen, so vermehren sich diese Zellen einige Generationen weiter, bis sie erneut aufhören zu wachsen. Dieser Status wird Krise genannt. Er ist durch massiven Zelltod und chromosomale Veränderungen gekennzeichnet. Sehr selten entstehen dabei aber auch Zellen, die sich unbegrenzt vermeh-

ren können. Dies wird Immortalisierung genannt (Wright et al. 1989).

Die verbleibende Anzahl an Zellgenerationen wird durch die Enden der Chromosomen, die Telomere, bestimmt. Diese bestehen aus mehreren Tausend Wiederholungen einer sechs Basenpaare langen Sequenz. Durch die Unfähigkeit der DNA-Polymerase die 3'-Enden der DNA komplett zu replizieren, verlieren die Telomere in jedem Zellzyklus 50 bis 100 Basenpaare DNA, bis sie die chromosomale DNA nicht mehr schützen können. Dies hat den Tod der Zelle zur Folge (Counter et al. 1998).

In allen Arten von malignen Zellen werden die Telomere erneuert (Shay und Bacchetti, 1997). Dies geschieht in 85 - 90% der Zellen durch eine Erhöhung der Telomerase-Expression. Die Telomerase fügt Hexanukleotide an die Enden der Telomer-DNA an (Bryan und Cech, 1999). Dadurch wird die Telomerlänge oberhalb einer kritischen Länge gehalten und ermöglicht dadurch eine unbegrenzte Vermehrung der Zellen.

1.1.5 Fortwährende Angiogenese

Um die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher zustellen ist jede Zelle weniger als 100 µm von einem kapillaren Blutgefäß entfernt. Während der Organentstehung wird diese Nähe durch koordiniertes Wachstum von Gefäßen und Parenchym sichergestellt. Ist ein Gewebe fertig aufgebaut, wird die Angiogenese, also die Neubildung von Blutgefäßen, streng reguliert (Hanahan und Weinberg, 2000). Gegensätzliche positive und negative Signale ermöglichen oder blockieren die Angiogenese. Diese Signale können z.B. durch lösliche Faktoren und ihre, auf der Zelloberfläche von endotheliellen Zellen befindlichen Rezeptoren vermittelt werden. Integrine und Adhensionsmoleküle spielen ebenfalls eine kritische Rolle. Zu den Angiogenese-induzierenden Faktoren gehören der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sowie die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren FGF1 und FGF2. Zu den Angiogenese-Inhibitoren gehört z.B. Thrombospondin-1. Alle diese Faktoren binden an Oberflächenrezeptoren. Integrine gehören ebenfalls zu den Regulatoren der Angiogenese. Dabei spielt vor allem die Zusammensetzung der Integrine eine Rolle (Varner und Cheresh, 1996; Eliceiri und Cheresh, 1999).

Die Fähigkeit Angiogenese zu induzieren und zu erhalten wird von Tumorzellen in einem oder mehreren separaten Schritten erworben. Dies geschieht durch eine Störung der Balance zwischen Angiogenese-fördernden und -inhibierenden Faktoren (Hanahan und Folkman, 1996). Dazu wird meist die Gentranskription verändert. Dies führt beispielsweise zu einer erhöhten Expression von VEGF und FGFs im Vergleich

zu normalem Gewebe. Auch die Expression von endogenen Inhibitoren wie Thrombospondin-1 kann verringert sein (Singh et al. 1995; Volpert et al. 1997; Carmeliet und Jain, 2000).

1.1.6 Gewebeinvasion und Metastasierung

Während der Entwicklung der meisten Krebsarten lösen sich einzelne Zellen aus dem Tumor und invasieren in umliegendes Gewebe oder gelangen über Blut- und Lymphgefäße an entfernte Orte und bilden dort neue Tumore (Metastasen). Invasion und Metastasierung sind sehr komplexe Prozesse, die nur unvollständig verstanden sind. Sie involvieren Änderungen in der Kopplung der Zellen zu ihrer nächsten Umgebung sowie die Aktivierung von extrazellulären Proteasen (Hanahan and Weinberg, Cell 2000). Viele der Proteine, die eine Zelle an ihre Umgebung binden, sind in invasierenden und metastasierenden Zellen verändert. Dazu gehören vor allem Zell-Zell-Adhäsions-Moleküle (CAMs), z.B. Immunglobuline und die Familie der Cadherine, und Integrine, die die Zelle an die Substrate der extrazellulären Matrix binden. Des Weiteren sind auch extrazelluläre Proteasen am invasiven und metastasierenden Phänotyp beteiligt (Coussens und Werb, 1996; Chambers und Matrisian, 1997). Dabei werden Proteasegene hochreguliert und Proteaseinhibitorgene herunterreguliert. Es wird angenommen, dass die Bindung aktiver Proteasen an die Zelloberfläche die Invasion von Krebszellen in das benachbarte Stroma durch Gefäßwände und durch normale Zellschichten hindurch, ermöglicht (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.1.7 Genomische Instabilität

Der Erwerb der vorgenannten sechs Fähigkeiten von Krebszellen während der Tumorprogression basiert direkt oder indirekt auf genomischen Veränderungen in Krebszellen. Die Mutation von spezifischen Genen ist jedoch ein ineffizienter Prozess, da die genomische Integrität durch verschiedene Mechanismen aufrecht erhalten wird. Dadurch sind Mutationen sehr seltene Ereignisse. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die Reihe von Mutationen, die für die Tumorentstehung nötig ist, während eines Menschenlebens entstehen kann. Dennoch entstehen Tumore mit einer beachtlichen Häufigkeit in der menschlichen Bevölkerung. Deshalb wurde postuliert, dass Tumorzellen eine erhöhte genomische Mutagenität erwerben müssen, damit die Tumorprogression stattfinden kann (Loeb 1991). Eine Vielzahl von *caretaker*-Proteinen, die für die Erfassung und Reparatur von DNA-Schäden zuständig sind, wurden mittlerweile als Tumorsuppressoren identifiziert (Lengauer et al. 1998).

Dazu gehört auch das p53-Protein, dessen Signalweg-Funktion in den meisten Tumoren fehlt (Levine 1997). Der Verlust der Funktion dieser *caretaker*-Proteine erlaubt eine genomische Instabilität und Variabilität, die die Entstehung mutierter Zellen mit selektiven Wachstumsvorteilen erlaubt. Der Erwerb von genomischer Instabilität ist damit eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung prämaligener Zellen, die in der Lage sind die anderen sechs Eigenschaften zu erwerben (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.2 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus vier verschiedenen Phasen. Während der ersten *gap*- oder der G₁-Phase wächst die Zelle und die Umgebung wird auf die zur Zellteilung nötigen Bedingungen hin überprüft. Außerdem wird alles nötige für die Replikation von DNA und Centrosomen in der darauf folgenden Synthese- oder S-Phase vorbereitet. Danach folgt die zweite *gap*- oder G₂-Phase, während der noch einmal geprüft wird, ob die Voraussetzungen für die Teilung gegeben sind. Weitere benötigte Proteine werden synthetisiert. In der abschließenden M-Phase finden die Mitose und die anschließende Cytokinese statt. G₁-, S- und G₂-Phase bilden gemeinsam die Interphase.

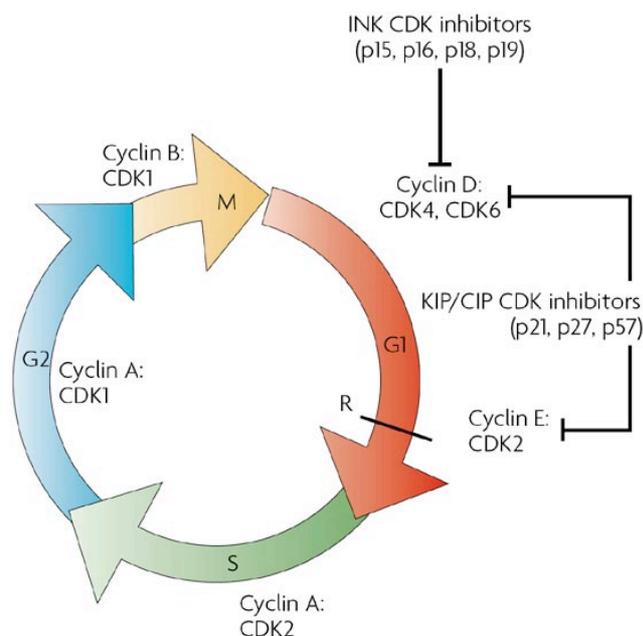


Abb. 1-2 Der eukaryotische Zellzyklus

Die Zelle durchläuft während des Zellzyklus vier verschiedene Phasen. Die G₁-Phase (rot) wird durch einen Komplex aus Cyclin D und einer cyclin-abhängigen Kinase, CDK4 oder CDK6, reguliert. Der Übergang zur S-Phase wird durch Cyclin E und CDK2 beeinflusst, während die S-Phase (grün) selbst durch Cyclin A und CDK2 reguliert wird. In der G₂-Phase (blau) übernehmen dann Cyclin A und CDK1 die regulatorische Funktion. Die M-Phase oder Mitose (gelb) wird durch Cyclin B und CDK1 reguliert. Die G₁-Phasen-Komplexe können durch CDK-Inhibitoren (CDKI) inhibiert werden (Dehay und Kennedy, 2007).

1.2.1 Cycline, CDKs und CDKI

Das Fortschreiten der Zelle durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus wird durch verschiedene Proteine kontrolliert. Dabei handelt es sich um Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI), die wiederum durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden. Cycline und CDKs bilden gemeinsam einen Komplex. Dabei bilden die Cycline die regulatorische Untereinheit, während die CDKs die katalytische Kinase-Untereinheit darstellen.

Die Expressionslevel der Cycline variieren aufgrund von Änderung der Transkription und Ubiquitin-vermittelter Degradierung stark während des gesamten Zellzyklus (Bicknell, Surry and Brooks 2003) (Nurse 2000). Die Expressionslevel der CDKs dagegen bleiben relativ konstant. Ihre Aktivität wird durch die Bindung der Cycline reguliert. Dabei binden die verschiedenen Cycline über eine 150 Aminosäuren lange homologe Region, die sogenannte Cyclin-Box, an das N-terminale Ende spezifischer CDKs. Der Komplex aus Cyclin D und CDK4 bzw. CDK6 ist während der G₁-Phase aktiv und wird am Ende dieser Phase durch den Komplex aus Cyclin E und CDK2 abgelöst. Dieser Komplex bleibt bis in die S-Phase aktiv und wird dort durch den Cyclin A/CDK2-Komplex begleitet. In der G₂-Phase geht Cyclin A dann eine Bindung mit CDK1 (CDC2) ein und wird in der späten G₂-Phase durch einen Komplex aus Cyclin B und CDK1 abgelöst, der bis in die M-Phase bestehen bleibt.

CDKs alleine besitzen keine messbare Kinaseaktivität. Ihre Aktivierung erfolgt erst durch die Cyclinbindung und die nachfolgende Phosphorylierung durch CAK (Cyclin H/CDK7) (CDK-aktivierende Kinase) und die Dephosphorylierung durch CDC25, einer Protein-Phosphatase. Die aktivierten Cyclin/CDK-Komplexe phosphorylieren eine Reihe spezifischer Substrate, die in der Zellzyklusprogression eine Rolle spielen, wie z.B. Rb *pocket*-Proteine, Lamine und Histone.

Neben den Cyclinen und CDKs als positiven Regulatoren des Zellzyklus, gibt es die CDKIs als negative Regulatoren (Bicknell, Surry und Brooks, 2003; Reed et al., 1994; Pines, 1997; Brooks, Poolman und Li, 1998). Dabei können zwei strukturell verschiedene Familien unterschieden werden. Die Mitglieder der INK4 (Inhibitor von CDK4)-Familie, p14, p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}, inhibieren spezifisch den G₁-Cyclin/CDK-Komplex aus Cyclin D und CDK4 bzw. CDK6 und spielen damit eine wichtige Rolle in der Kontrolle der G₁-Phase. Die Mitglieder der CIP/KIP-Familie (CDK-interagierendes Protein/Kinase-Inhibitor-Protein), p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2},

besitzen eine 70 Aminosäuren lange Region am N-Terminus, die bei allen Mitgliedern zu 38 - 40% identisch ist. Sie dient der Cyclin-Bindung bzw. Kinase-Inhibition (Brooks, Poolman und Li, 1998; Pines, 1997; Gartel, Serfas und Tyner, 1996). Die CIP/KIP-Proteine interagieren während des gesamten Zellzyklus mit den folgenden Komplexen: Cyclin E/CDK2, Cyclin D/CDK4, Cyclin D/CDK6, Cyclin A/CDK2 und Cyclin B/CDK1. Antiproliferative Signale, wie Kontaktinhibition, Seneszenz, extrazelluläre antimitotische Faktoren und Zellzykluskontrollpunkte, induzieren die Expression der CIP/KIP-Proteine. Die Familien der INK4- und CIP/KIP-Proteine haben unterschiedliche Wirkmechanismen. Erstere blockieren die Cyclin-Bindung indirekt durch allosterische Änderungen in den CDKs (Serrano, 1997), während letztere den kompletten Cyclin/CDK-Komplex binden und inaktivieren (Shekhar et al., 2002). Im Falle der CIP/KIP-Familie gibt es auch Hinweise darauf, dass einige der Mitglieder in Abhängigkeit von der Bindungsstöchiometrie fördernd für die Cyclin/CDK-Bindung wirken können (Zhang, Hannon und Beach, 1994).

1.2.2 G₁-Progression

Für die Passage durch die G₁-Phase des Zellzyklus ist die Aktivierung der Cyclin D/CDK4- und Cyclin D/CDK6-Komplexe essentiell. Die Cyclin D-Expression wird direkt durch den Ras/MAPK-Signalweg kontrolliert. Diese Kontrolle wird hauptsächlich von der MAP-Kinase vermittelt, welche die Aktivierung von AP1- und ETS-Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Die Transkriptionsfaktoren transaktivieren dann den Cyclin D-Promotor über spezifische Bindungsstellen (Lavoie et al., 1996; Liu et al., 1995). Der Ras/MAPK-Signalweg reguliert außerdem direkt die Synthese der CIP/KIP-Familie (vgl. 1.2.1) und kann dadurch die Bildung der Komplexe aus Cyclin D und CDK4 bzw. CDK6 in der frühen G₁-Phase fördern.

Die Aktivierung dieser Komplexe führt zu einer Phosphorylierung von bestimmten Rb *pocket*-Proteinen, was den Übergang von der G₁- zur S-Phase antreibt. Die während der G₁-Phase hypophosphorylierten Rb *pocket*-Proteine binden und blockieren E2F-Transkriptionsfaktoren. Durch die folgende Hyperphosphorylierung der Rb-Proteine, durch Cyclin D/CDK4, Cyclin D/CDK6 und Cyclin E/CDK2, werden die E2F-Transkriptionsfaktoren freigegeben und transaktivieren Promotoren von Genen, die für das Voranschreiten der S-Phase von Bedeutung sind, wie z. B. Cyclin E und Cyclin A. Danach werden die E2F-Transkriptionsfaktoren beispielsweise durch Cyclin E oder Cyclin A phosphoryliert und inaktiviert oder Ubiquitin-abhängig degradiert. (Krek et al., 1994; Hateboer et al., 1996; Hofmann et al., 1996)

1.2.3 S-Phase

Die erhöhte Expression von Cyclin E markiert den Übergang zur S-Phase. Dabei ist die Cyclin E/CDK2-Aktivität wichtig für den Beginn der DNA-Replikation (Ohtsubo und Roberts, 1993; Resnitzky et al., 1994). Zusätzlich wird die Histon-Gen-Expression von CyclinE/CDK2 reguliert (Zhao et al., 2000; Ma et al., 2000). Des Weiteren wird mit Beginn der S-Phase auch der Cyclin A/CDK2-Komplex gebildet, der ebenso wie Cyclin E/CDK2 wichtig für die DNA-Replikation ist (Ohtsubo et al., 1995; Resnitzky, Hengst und Reed, 1995; Jiang et al., 1999). Die DNA-Replikation wird außerdem über weitere Moleküle und Mechanismen kontrolliert, um eine Re-Replikation zu verhindern. Neben der Replikation der DNA findet auch die Duplikation der Centrosomen in der S-Phase statt (vgl. 1.2.8). Fehler bei der Koordination zwischen Centrosomen-Duplikation und DNA-Replikation führen zu einer anormalen Segregation der Chromosomen und damit zu einer chromosomalen Instabilität. Bei der Centrosomen-Duplikation spielt der Cyclin E/CDK2-Komplex ebenfalls eine Rolle (Lacey, Jackson und Stearns, 1999).

1.2.4 G₂-Phase

In der G₂-Phase überprüft die Zelle, ob die DNA korrekt repliziert wurde. Dieser sogenannte DNA-Replikations-Kontrollpunkt reagiert bei teilweise replizierter DNA oder DNA-Schäden und blockiert den Beginn der Mitose. Dies geschieht über unterschiedliche Signalwege. Der p53-abhängige Signalweg detektiert DNA-Schäden, die z.B. durch ionisierende Strahlung entstehen, und führt zu einer Stabilisierung und Akkumulation von p53. Dies wiederum aktiviert und beeinflusst verschiedene Mechanismen in der Zelle, wie beispielsweise weitere Zellzykluskontrollpunkte, Gen-transaktivierung, genomische Stabilität und Apoptose (Lakin, Hann und Jackson, 1999; Colman, Afshari und Barrett, 2000; Ryan, Phillips und Vousden, 2001; Taylor und Stark, 2001; Wahl und Carr, 2001).

p53 ist normalerweise mit der Ubiquitinligase Mdm2 (*murine double minute 2*) assoziiert und dadurch relativ instabil. Eine Phosphorylierung von p53 an Ser15, durch z.B. ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) (Shieh et al., 1997; Canman und Lim, 1998), führt zu einer Dissoziation von p53 und Mdm2. Dadurch wird p53 stabilisiert, wodurch wiederum der Promotor des CDKI-Moleküls p21 transaktiviert wird. Die erhöhte p21-Expression führt zum Zellzyklusarrest (Nayak und Das, 2002) (vgl. Abb. 1-3). Während des Arrestes können die vorhandenen DNA-Schäden repariert werden.

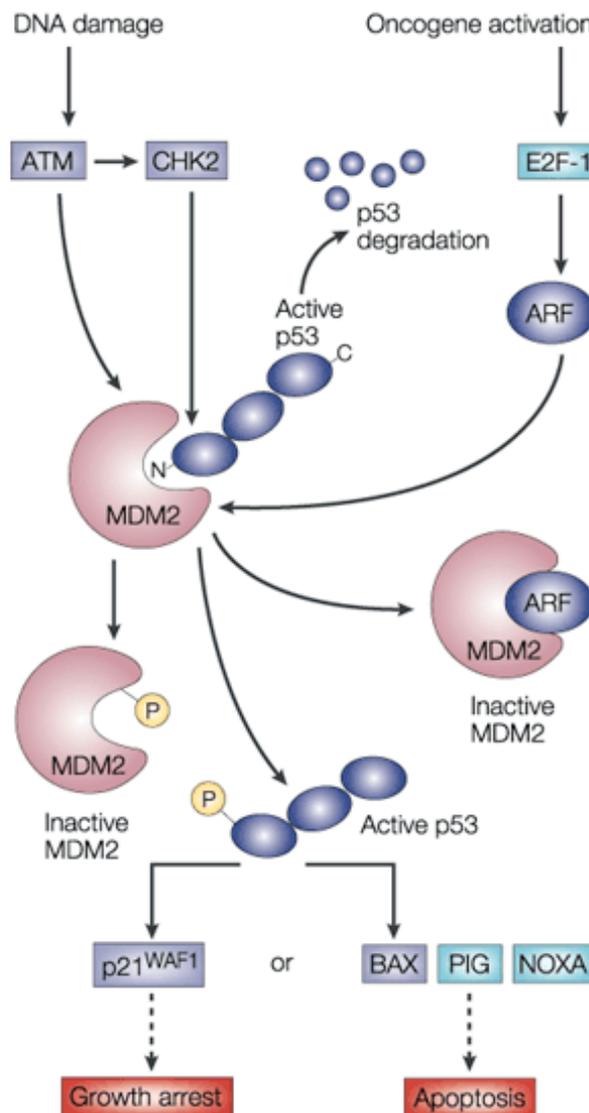


Abb. 1-3 Regulation der p53-Aktivität durch Mdm2.

In normalen Zellen wird der Transkriptionsfaktor p53 durch die Ubiquitinligase Mdm2 inaktiviert, indem er ubiquitiniert und im Proteasom degradiert wird. Durch verschiedene Arten von Stress, z.B. DNA-Schäden, werden p53 und Mdm2 phosphoryliert und dissoziieren von einander. Das aktivierte p53 kann dann die Promotoren seiner Zielgene transaktivieren. Dies führt zu einem Wachstumsstopp oder zu Apoptose (Soussi und Bérout, 2001).

Ein weiterer Signalweg des DNA-Replikationskontrollpunkts ist p53-unabhängig und involviert stattdessen die Familie der Rad-Proteine (Kelly und Brown, 2000; Boddy und Russell, 1999). Die Proteine dieser Familie sind in der Lage DNA-Schäden, wie z.B. Strangbrüche, zu erkennen und dann den Kontrollpunkt zu aktivieren. In der Folge wird die Zelle durch Phosphorylierung und Inhibierung des mitotischen Aktivators CDC25 in der G₂-Phase blockiert (Brown et al., 1999; Chaturvedi et al., 1999; Matsuoka, Huang und Elledge, 1998). Durch diese Blockade kann die Zelle die Schäden entweder reparieren oder die Apoptose einleiten.

1.2.5 G₂/M-Übergang

Der Hauptregulator des G₂/M-Übergangs ist der Cyclin B/CDC2-Komplex. Die Aktivierung und Inaktivierung dieses Komplexes erfolgt über Phosphorylierung an verschiedenen Positionen. Zur Aktivierung muss, wie in allen CDKs, Thr160 in der konservierten T-Schleifen-Region von CDC2 phosphoryliert werden. Während der G₂-Phase wird der Komplex durch Phosphorylierung von CDC2 an Thr14 und Tyr15 inaktiviert. Diese inhibitorische Phosphorylierung erfolgt durch die Kinasen Wee1 und Myt1. Die Aktivierung von Cyclin B/CDC2 erfolgt dann durch Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase CDC25C. Dies markiert den Übergang zur M-Phase.

1.2.6 Mitose (M-Phase)

Die Mitose wird in 5 verschiedene Phasen unterteilt.

- a) Prophase: Sie ist durch die Kondensierung der Chromosomen im Kern und den Abbau der Kernmembran gekennzeichnet.
- b) Prometaphase: Die mitotische Spindel wird gebildet. Für eine korrekte Zellteilung sind die folgenden drei Ereignisse essentiell:
 - Die bipolare Spindelachse muss gebildet werden.
 - Die Tochterchromatiden eines jeden replizierten Chromosoms müssen sich den gegenüberliegenden Spindelpolen zuordnen.
 - Die Chromosomen müssen in oder nahe der Spindeläquatorebene angeordnet werden.
- c) Metaphase: Alle Chromosomen befinden sich in der Nähe des Spindeläquators und bilden gemeinsam die Metaphaseplatte.
- d) Anaphase: Die Schwesterchromatiden der Chromosomen werden separiert und bilden ab jetzt zwei unabhängige Chromosomen.
- e) Telophase: Die Chromosomen dekontensieren wieder und es wird jeweils eine neue Kernhülle gebildet. Ein kontraktiler Ring wird gebildet, um die Zellen in zwei Tochterzellen trennen zu können.

Während der Progression durch die Mitose spielen verschiedene regulatorische Proteine eine Rolle. Dazu gehören unter anderem die CDC25-Phosphatasen, mitotische Cyclin/CDK-Komplexe und der Anaphase-*promoting*-Komplex (APC). Die Familie der CDC25-Proteinphosphatasen besteht aus drei Mitgliedern: CDC25A, CDC25B und CDC25C (Sadhu et al., 1990; Galaktionov und Beach, 1991; Harris, 1996). CDC25A spielt hauptsächlich bei der Regulierung des G₁/S-Übergangs eine Rolle. CDC25B und CDC25C dagegen sind die Hauptregulatoren der Mitose. CDC25B sorgt durch

die initiale Dephosphorylierung von Cyclin B/CDC2 für eine Aktivierung des Komplexes. Cyclin B/CDC2 wiederum phosphoryliert CDC25C, welches über eine positive Rückkopplungsschleife für eine weitere Phosphorylierung und damit schnelle Aktivierung von Cyclin B/CDC2 am Beginn der M-Phase sorgt (Hoffmann et al., 1993).

Cyclin B/CDC2 ist während der Interphase im Zytoplasma lokalisiert, wird aber in der Prophase in den Kern transportiert. Dies geschieht wahrscheinlich über die Hyperphosphorylierung einer N-terminalen Region von Cyclin B (Hagting et al., 1999; Pines und Hunter, 1994; Yang et al., 1998) oder durch Bindung von anderen Proteinen, die im Kern lokalisiert sind. Die Hauptaufgabe von Cyclin B/CDC2 ist die komplette Reorganisation der zellulären Architektur während der Mitose. Dazu gehört der Abbau der Kernmembran, das Abrunden der Zelle, die Fragmentierung des Golgi-Apparates sowie die Centrosomen-Separation (Blangy et al., 1995; Lowe et al., 1998; Yamashiro et al., 1990).

Der Austritt der Zelle aus der Mitose erfordert die Ubiquitin-vermittelte Degradierung der mitotischen Cycline über die *cyclin destruction box*. Dies wird durch die APC-Ubiquitin-Ligase reguliert. APC ist eine Multi-Untereinheiten-Ligase, die aus einer Reihe verschiedener Proteinuntereinheiten besteht (Glutzer, Murray und Kirschner, 1991; Harper, Burton und Solomon, 2002). Während der G₁- und der S-Phase ist APC inaktiv. Durch Phosphorylierung durch Plk1 oder Cyclin B/CDC2 wird APC in der Mitose aktiviert (Golan, Yudkovsky und Hershko, 2002; Kotani et al., 1998; Shteinberg et al., 1999). APC wird außerdem für die Trennung der Schwesterchromatiden benötigt, da es Securin, das für das Zusammenhalten der Chromatiden nach der Replikation durch Cohesine verantwortlich ist, zerstört und so die Trennung ermöglicht.

1.2.7 Cytokinese

Am Ende der Mitose muss die Zellteilung durch die Cytokinese komplettiert werden. Dazu bildet sich eine Furche an der Teilungsstelle. Diese enthält Aktin, Myosin und andere Proteine, die dann den kontraktilen Ring bilden (Noguchi et al., 2001). Nach der Chromosomensegregation werden die Mikrotubuli in der Mittelregion der Spindel gebündelt und bilden die Spindelmittelzone. Durch die Kontraktion des kontraktilen Rings wird eine Membranbarriere zwischen den Zellen gebildet. Die Spindelmittelzone bleibt zunächst noch verbunden und bildet eine cytoplasmatische Brücke, die am Ende getrennt wird.

(Andersen et al., 2003), deren Anzahl vom Fortschreiten des Centrosoms und der Zelle durch den Zellzyklus abhängt. In sich teilenden Zellen bilden die beiden Centrosomen die Pole der bipolaren mitotischen Spindel. Eine korrekte Anzahl an Centrosomen ist daher essentiell für eine fehlerfreie Zellteilung. Ähnlich wie DNA, werden auch die Centrosomen einmal pro Zellzyklus verdoppelt. Es gibt allerdings keine Kontrollpunkte, die bei fehlerhafter Verdopplung den Zellzyklus blockieren (Uetake und Sluder, 2004) (Wong und Stearns, 2005).

Während der Interphase besitzt jede Zelle nur ein Centrosom. Die Verdopplung beginnt während der G_1 -/S-Phase, so dass am Ende der G_2 -Phase jede Zelle zwei Centrosomen besitzt. Dieser Verdopplungsprozess besteht aus fünf Schritten (vgl. Abb. 1-4). Der erste Schritt, die Disorientierung, findet am Ende der G_1 -Phase statt. Jedes Centrosom besteht aus zwei Centriolen, der Mutter- und der Tochtercentriole. Dabei steht die Tochtercentriole in einem rechten Winkel zum unteren Ende der Muttercentriole. Bei der Disorientierung löst sich diese feste Orientierung der beiden Centriolen, sie bleiben aber weiterhin über eine Faser verbunden. Der zweite Schritt ist die Duplikation. Am Anfang der S-Phase entstehen im rechten Winkel zu den unteren Enden der beiden Centriolen sogenannte Pro-Centriolen (die neuen Tochtercentriolen). Während des dritten Schrittes, der Elongation, wachsen die Pro-Centriolen während S- und G_2 -Phase zur vollen Länge heran. In der G_2 -/M-Phase kommt es zur Reifung der Centrosomen. Dabei erfahren die Centrosomen aufgrund einer Anhäufung verschiedener Proteine, darunter auch das γ -TuRC, eine enorme Vergrößerung (Khodjakov und Rieder, 1999). Durch die Zunahme an γ -TuRC in der PCM kommt es im Centrosom zu einer vermehrten Bildung von Mikrotubuli. Im letzten Schritt werden die beiden Centrosomen getrennt und bewegen sich zu den gegenüberliegenden Seiten des Kerns um die mitotische Spindel zu bilden. Diese Schritte werden von verschiedenen Kinasen reguliert. Außerdem spielen auch andere Proteinmodifikationen, wie Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung eine Rolle bei der Regulation.

In vielen Tumorarten werden anormale Centrosomen gefunden. Die Veränderungen bestehen vor allem aus Amplifikationen der Centrosomen-Anzahl, die häufig durch Aneuploidie begleitet werden. Es wird angenommen, dass eine zu große Anzahl an Centrosomen einen Mutationen begünstigenden Phänotyp kreiert, der die maligne Transformation fördert (Sankaran und Parvin, 2006). Verdoppelt sich die Centrosomenzahl auf vier nach der DNA-Replikation, ist es möglich, dass sich trotzdem eine

bipolare Spindel bildet und die Chromosomen normal getrennt werden. Häufig bildet sich jedoch eine multipolare Spindel, wodurch die Vollendung der Zellteilung für die Zelle katastrophal wäre. Normalerweise würde eine solche Zelle zu Grunde gehen, oft wird jedoch die Zellteilung nicht beendet, so dass eine G₁-Zelle mit zwei Centrosomen und einem tetraploiden Chromosomensatz entsteht. Diese Zellen sind weiterhin dazu in der Lage, den Zellzyklus zu durchlaufen (Uetake und Sluder, 2004; Wong und Stearns, 2005). Weitere Zellteilungen führen dann zu Zellen, die trotz genomischer Amplifikationen und Deletionen weiter überleben. Studien an tetraploiden Zellen haben außerdem gezeigt, dass diese Zellen eher tumorigen sind als genetisch identische diploide Zellen (Fujiwara et al., 2005). Dies legt nahe, dass eine vermehrte Duplikation von Centrosomen Krebs verursachen kann.

Es gibt mehrere Wege, die zu überzähligen Centrosomen führen können (Nigg, 2002):

- a. Eine Reduplikation der Centrosomen innerhalb eines Zellzyklus
- b. Ein Scheitern der Cytokinese und eine Reduplikation im nächsten Zellzyklus
- c. Fragmentierung
- d. Zellfusion

Bis jetzt ist es jedoch nicht möglich die genaue Ursache für die numerische Abberation der Centrosomen zu benennen. Es wurden jedoch schon mehrere Gene bzw. Proteine und die entsprechenden Signalwege, damit in Verbindung gebracht. Dazu gehören p53, p21, MDM2 (p53-Signalweg), ATR, Brca1 und 2 (DNA-Reparatur), Skp2, RAD6 (Protein-Degradierung) sowie Aurora-A und Survivin (Mitose) (Nigg, 2002).

1.3 Die Familie der HtrA-Serin-Proteasen

Die HtrA-Familie der Serin-Proteasen wurde ursprünglich im Bakterium *E. coli* entdeckt. Ihre Mitglieder DegP, DegS und DegQ spielen hier eine wichtige Rolle in der Protein-Qualitätskontrolle (Lipinska, Sharma und Georgopoulos, 1988; Strauch und Beckwith, 1988; Pallen und Wren, 1997). Bakterielle HtrAs können Schlüsselsensoren und -regulatoren des *unfolded protein response*-Signalwegs sein. Sie können außerdem beschädigte oder falsch lokalisierte Proteine reparieren oder degradieren (Ehrmann und Clausen, 2004; Wilken et al., 2004; Spiess et al., 1999).

Später wurden viele Homologe in Gram-negativen und -positiven Bakterien, Pflanzen und Säugetieren beschrieben. Diese Proteine sind alle durch das Vorhandensein

einer Chymotrypsin-ähnlichen Protease-Domäne und mindestens einer C-terminalen PDZ-Domäne charakterisiert (vgl. Abb. 1-5). Durch die PDZ-Domäne wird die proteolytische Aktivität reguliert. Im Gegensatz zu klassischen Serin-Proteasen ist der Wechsel vom inaktiven in den aktiven Zustand reversibel. Die Aktivierung der enzymatischen Aktivität erfolgt durch die Bindung der C-Termini von Substraten an die PDZ-Domäne der HtrA-Protease und eine damit verbundene allosterische Konformationsänderung (Hasselblatt et al., 2007; Meltzer et al., 2008)

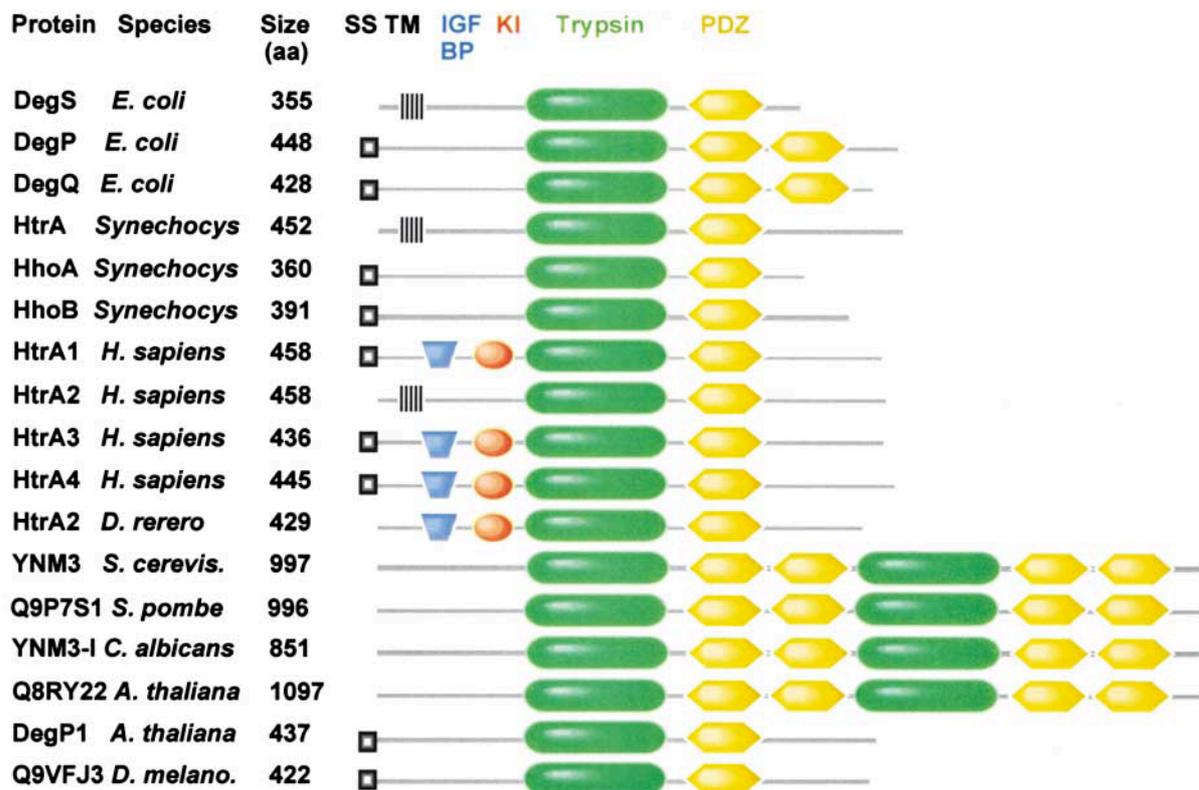


Abb. 1-5 Die Proteine der HtrA-Familie

Alle Mitglieder der HtrA-Familie besitzen mindestens eine Trypsin-ähnliche Domäne (Trypsin, grün) sowie mindestens eine C-terminale PDZ-Domäne (PDZ, gelb). Zusätzlich besitzen die meisten Mitglieder noch eine N-terminale Signalsequenz (SS) oder eine Transmembrandomäne (TM). Drei der humanen Mitglieder sind außerdem durch das Vorhandensein einer IGFBP-ähnlichen Domäne (IGFBP, blau) und einer Kazal-ähnlichen Protease-Inhibitor-domäne (KI, rot) gekennzeichnet (Clausen, Southan und Ehrmann, 2002).

Bis jetzt wurden vier humane Homologe identifiziert: HtrA1 (L56 oder PRSS11), HtrA2 (Omi), HtrA3 (PRSP) und HtrA4. HtrA1, HtrA3 und HtrA4 weisen dabei die größte strukturelle Ähnlichkeit auf. Ihr N-Terminus besteht aus einer Signalsequenz, einer IGFBP-ähnlichen Domäne sowie einer Kazal-ähnlichen Protease-Inhibitor-domäne. Der N-Terminus von HtrA2 dagegen besitzt keines dieser Merkmale, sondern weist stattdessen eine Transmembrandomäne auf. Funktionell sind bisher nur HtrA1, HtrA2 und HtrA3 weitergehend charakterisiert worden. Zu HtrA4 sind

keine Daten in der Literatur zu finden.

1.3.1 HtrA1

HtrA1 ist das erste sequenzierte Mitglied der humanen HtrA-Protein-Familie und wurde als herunterreguliertes Gen in SV40-transformierten Fibroblasten identifiziert (Zumbrunn und Trueb, 1996). Das Expressionsmuster von HtrA1 unterscheidet sich stark in den verschiedenen Gewebearten (De Luca et al., 2003). Die stärkste Expression zeigt HtrA1 in den oberen Hautschichten, im proliferativen Endometrium, in den Eierstöcken, in Teilen des Bindegewebes sowie in exokrinen Teilen von Leber, Niere und Bauchspeicheldrüse (De Luca et al., 2003).

Neben der Herunterregulation in SV40-transformierten Fibroblasten wurde HtrA1 auch in ovariellen Tumoren (Shridhar et al., 2002) und während der Melanomprogression (Baldi et al., 2002) als herunterreguliert gefunden. Es wurde deshalb als Tumorsuppressor postuliert und es wurde ihm eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation zugeschrieben. Ein weiteres Merkmal von HtrA1, das für eine Rolle als Tumorsuppressor spricht, ist die große Homologie des N-Terminus (IGFBP-ähnliche Domäne und Kazal-ähnliche Proteaseinhibitor-Domäne) zum Tumorsuppressor Mac25. Dieses Protein ist in der Lage IGFI und IGFII zu binden und nimmt dadurch Einfluss auf die Kontrolle von Wachstumsfaktoren. Mac25 ist außerdem ein Wachstumssuppressor in Osteosarkomen (Kato, 2000; Kato et al., 1996). Dies legt nahe, dass auch die Aktivität von sekretiertem HtrA1 in Verbindung mit der Regulation von Zellwachstum über Wachstumsfaktoren steht, die über die Mac25-Domäne gebunden werden (Baldi et al., 2002; Zumbrunn und Trueb, 1996). Des Weiteren wurde HtrA1 als neuer Inhibitor der TGF β -Familie beschrieben (Oka et al., 2004).

In Ovarialtumorzellen konnte gezeigt werden, dass die verminderte Expression von HtrA1 die Resistenz gegen die Chemotherapeutika Paclitaxel und cis-Platin fördert. Die erhöhte Expression von HtrA1 dagegen führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber diesen beiden Chemotherapeutika (J. Chien et al., 2006). Intrazellulär ist HtrA1 an den Mikrotubuli lokalisiert (unveröffentlichte Daten, A. Tennstädt, AG Ehrmann; Chien et al., 2009). Diese Lokalisation bleibt auch während der Spindelbildung in der Mitose erhalten. Bei einer Immunpräzipitation werden α -, β - und γ -Tubulin mit HtrA1 co-präzipitiert, weshalb Tubuline als potentielle Bindungspartner und Substrate von HtrA1 postuliert wurden (Chien et al., 2009).

Die Regulation der HtrA1-Expression ist bis jetzt weitgehend unbekannt. Es gibt je-

doch Hinweise darauf, dass die HtrA1-Expression durch epigenetische Mechanismen reguliert wird (unveröffentlichte Daten, I. Irle, AG Ehrmann; Chien et al., 2009). Weitere Regulationsmechanismen sind bisher nicht bekannt.

1.3.2 HtrA2

HtrA2 besitzt im Gegensatz zu HtrA1, HtrA3 und HtrA4 am N-Terminus ein mitochondriales Lokalisationssignal (MLS). Dadurch lokalisiert HtrA2 im mitochondrialen Intramembranraum (Hegde et al., 2002; Markowitz et al., 1995). In ruhenden Zellen konnte jedoch festgestellt werden, dass sich ein Teil des Proteins im Kern befindet. (Markowitz et al., 1995; Gray et al., 2000). Der Transmembrananker hinter dem MLS verankert das Vorläuferprotein in der inneren Mitochondrienmembran. Hier kommt es dann zur proteolytischen Reifung, wodurch das Protein um die ersten 133 Aminosäuren verkürzt wird. Der neuentstandene N-Terminus beinhaltet ein Apoptoseinhibitorprotein-(IAP) bindendes Motiv (IBM). Dieses ist verwandt mit den IAP-Inhibitoren Reaper, Hid und Grim aus *Drosophila* sowie dem IAP-Antagonisten Smac/DIABLO aus Säugetieren (Hegde et al., 2002; Markowitz et al., 1995; Verhagen et al., 2002). DNA-Schäden, *Death Receptor*-Aktivierung und viele andere apoptotische Stimuli verursachen die Translokation der gereiften Protease ins Zytosol, wo sie über Caspase-abhängige und -unabhängige Mechanismen die Apoptose fördert (Hegde et al., 2002; Markowitz et al., 1995; Yang et al., 2003). Martins und Kollegen zeigten dagegen anhand von HtrA2-*knockout*-Mäusen, dass die Protease-Funktion von HtrA2 wesentlich wichtiger ist als das IAP-bindende Motiv, da die Tiere eine Parkinson-ähnliche neurodegenerative Veränderung aufweisen. Der HtrA2-*knockout* hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die Apoptoserate in den Mäusen. Deshalb stellen Martins und Kollegen die Vermutung auf, dass HtrA2 in einer ähnlichen, Stress-protaktiven Weise funktioniert wie die bakteriellen Homologe DegS und DegP und nicht wie die proapoptotischen Reaper-Proteine in *Drosophila melanogaster* (Martins et al., 2004).

Weiterhin wird diskutiert, dass eine Aktivierung der Proteaseaktivität von HtrA2 durch Phosphorylierung möglich ist. Diese Phosphorylierung ist abhängig von der zytosolischen MAP-Kinase p38 und von der putativen mitochondrialen Proteinkinase PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) (Beilina et al., 2005), einem bekannten Prädispositions-Faktor für die Parkinsonsche Erkrankung. Dies und die Tatsache, dass eine Mutation der Phosphorylierungsstelle in Parkinson-Patienten nachgewiesen werden kann, (Plun-Favreau et al., 2007) legen nahe, dass HtrA2 mit dieser Erkrankung in

Verbindung steht.

Wird die *unfolded protein response* (UPR) beispielsweise durch Tunicamycin oder Hitzeschock angesprochen, so wird die HtrA2-Expression um ein mehrfaches erhöht. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass HtrA2 eine Rolle in der Kontrolle der Proteinfaltung in Mitochondrien und damit der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase spielt (Gray et al., 2000)

1.3.3 HtrA3

HtrA3 besitzt eine 56%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit HtrA1. Auch strukturell ähneln sich die beiden Proteasen sehr und besitzen die gleiche Domänenabfolge. Von HtrA3 werden zwei *splice*-Varianten exprimiert, eine lange Form und eine kurze Form, die keine PDZ-Domäne aufweist.

HtrA3 wurde bis jetzt vor allem mit Einnistung und Plazentabildung während der Schwangerschaft in Zusammenhang gebracht (Nie et al., 2003). Die höchste Expression in Normalgewebe zeigen Herz, Eierstöcke, Uterus, Plazenta und Blase.

Weitere Funktionen von HtrA3 sind bis jetzt nicht bekannt. Durch die strukturelle Ähnlichkeit ist es jedoch wahrscheinlich, dass es ähnliche Funktionen wie HtrA1 hat. Dafür spricht, dass HtrA3 wie HtrA1 eine inhibitorische Aktivität für den TGF β -Signalweg zeigt (Tocharus et al., 2004). Des Weiteren scheinen HtrA1 und HtrA3 komplementäre Funktionen in der Entwicklung von Auge und skeletalem Gewebe zu haben, zeigen dabei jedoch ein unterschiedliches Expressionsmuster.

Auch für HtrA3 gibt es Hinweise, dass es eine Tumorsuppressorfunktion besitzt, da es während der Progression von endometrialen Tumoren herunterreguliert wird. (Bowden et al., 2006)

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es die Serin-Protease HtrA1 hinsichtlich ihrer Funktion als Tumorsuppressor zu charakterisieren und zu untersuchen, ob HtrA1 während der malignen Transformation sowie der Zellteilung eine Rolle spielt. Weiterhin sollen neue Regulationsmechanismen der HtrA1-Expression untersucht werden.

Die humane Serin-Protease HtrA1 wurde wiederholt als Tumorsuppressorprotein beschrieben und mit der malignen Transformation in Verbindung gebracht (Baldi et al., 2002). Die genaue Funktion von HtrA1 während dieser Prozesse sowie die Auswirkungen eines Verlusts der HtrA1-Expression auf die Zelle wurden jedoch noch nicht ausreichend untersucht. In dieser Arbeit sollen daher bestimmte Zellmerkmale und -prozesse, die während der malignen Transformation verändert werden, in Zellen mit verminderter HtrA1-Expression charakterisiert werden. Dazu gehören das Wachstums- und Migrationsverhalten sowie die genetische Stabilität. Letztere soll mit Hilfe der Durchflusszytometrie sowie anschließender Karyotypisierung der Zellen analysiert werden. Zusätzlich werden die verwendeten Zellen hinsichtlich einer veränderten Morphologie während der Zellteilung untersucht. Hierfür sollen die Zellen mit geeigneten Methoden so synchronisiert werden, dass sich möglichst große Anteile der Population in der gleichen Zellzyklusphase befinden. Die einzelnen Zellteilungsstadien lassen sich dann mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Lasermikroskopie untersuchen. Die gleichen Synchronisationsmethoden ermöglichen zusätzlich eine zellzyklusabhängige Analyse der HtrA1-Expression.

Für die Untersuchungen werden sowohl primäre embryonale Fibroblastenzellen aus HtrA1-*knockout*-Mäusen und deren HtrA1-Wildtyp-Geschwistern als auch durch virale Transduktion hergestellte HtrA1-*knockdown*-Derivate der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW480 verwendet.

Die HtrA-Proteine sind potentiell an der zellulären Stressantwort beteiligt sind. Deshalb soll durch Behandlung von Zellen mit verschiedenen Chemikalien eine differentielle Regulation von HtrA1 erreicht werden und diese mit Hilfe eines cDNA-*Microarrays* genauer charakterisiert werden. Auf diesem Weg sollen mögliche neue Regulationswege von HtrA1 identifiziert werden.

		virale Transduktion mit lentiviralem Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen HtrA1 codiert	
SW480 p50LV	<i>Homo sapiens</i>	Kolorektales Adenokarzinom; virale Transduktion mit leerem retroviralem Expressionsvektor	diese Arbeit
SW480 p50HtrA1	<i>Homo sapiens</i>	Kolorektales Adenokarzinom; virale Transduktion mit retroviralem Expressionsvektor, der für HtrA1 codiert	diese Arbeit
U373 MG	<i>Homo sapiens</i>	Glioblastom-Astrocytom-Zelllinie	ECACC
U373 plkoLV	<i>Homo sapiens</i>	Glioblastom-Astrocytom-Zelllinie; virale Transduktion mit leerem lentiviralem Expressionsvektor	unsere Arbeitsgruppe
U373 shHtrA1 D3	<i>Homo sapiens</i>	Glioblastom-Astrocytom-Zelllinie; virale Transduktion mit lentiviralem Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen HtrA1 codiert	unsere Arbeitsgruppe
U373 shHtrA1 S8	<i>Homo sapiens</i>	Glioblastom-Astrocytom-Zelllinie; virale Transduktion mit lentiviralem Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen HtrA1 codiert	unsere Arbeitsgruppe
MEF 288(1) wt	<i>Mus musculus</i>	Primäre embryonale Mausfibroblasten, Wildtyp für HtrA1	Arbeitsgruppe Prof. Clarke, Cardiff
MEF 145(2) HtrA1 +/-	<i>Mus musculus</i>	Primäre embryonale Mausfibroblasten, homozygoter <i>knockout</i> für HtrA1	Arbeitsgruppe Prof. Clarke, Cardiff
MEF 145(3) HtrA1 +/-	<i>Mus musculus</i>	Primäre embryonale Mausfibroblasten, homozygoter <i>knockout</i> für HtrA1	Arbeitsgruppe Prof. Clarke, Cardiff

3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Fötale Kälberserum (FCS)

Penicillin/Streptomycin (10000 units/ml PenicillinG, 10000 µg/ml Streptomycinsulfat)

Geneticin (G418)

Puromycin

Nicht essentielle Aminosäuren

Trypsin/EDTA

Puromycin wurde von Sigma-Aldrich, München, Deutschland bezogen. Alle anderen Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

3.1.5 Puffer und Lösungen

<u>Acrylamid</u>	30% Rotiphorese Gel
<u>4x SDS-Probenpuffer</u>	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerol 0,04% (w/v) Bromphenol Blau 30 mM DTT
<u>6 x DNA-Probenpuffer</u>	30% (v/v) Glycin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol
<u>10x TBS</u>	200 mM Tris-HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl
<u>50x TAE-Puffer</u>	50 mM EDTA 2 M Tris-Acetat, pH 8
<u>Lysispuffer-eukaryotische Zellen</u>	50 mM Tris-HCl pH 7,4 100 mM MgCl ₂ 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10% (v/v) Glycin 1% (v/v) TritonX-100 0,1% (w/v) SDS Protease-Inhibitor

<u>SDS-Laufpuffer</u>	240 mM Tris-HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerol
<u>SDS-Sammelgelpuffer</u>	0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
<u>SDS-Trenngelpuffer</u>	1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
<u>TBST-Waschpuffer</u>	TBS 0,1% (v/v) Tween 20
<u>Transferpuffer</u>	15 mM Tris-HCl, pH 8,3 120 mM Glycin 20% (v/v) Methanol 0,2% SDS

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in *Aqua bidest* angesetzt.

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primärantikörper

Tabelle 3-3 Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
anti- β -Tubulin	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
anti- γ -Tubulin (mouse)	Sigma-Aldrich, München
anti-Aktin	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
anti-HtrA1	R&D Systems, Wiesbaden
anti-Mdm2	BD Biosciences, Heidelberg
anti-p53	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.6.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3-4 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
anti-mouse-Alexa488	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
anti-rabbit-Alexa488	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
anti-mouse-HRP	GE Healthcare, Freiburg
anti-rabbit-HRP	GE Healthcare, Freiburg

3.1.7 Biochemikalien und Chemikalien

3.1.7.1 Proteine und Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von NEB, Beverly, USA bezogen.

3.1.7.2 Protein- und Nukleinsäurestandards

2-log DNA Ladder	NEB, Beverly, USA
peqGold Protein Marker	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
<i>Prestained</i> SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München
<i>Unstained</i> SDS-PAGE Standard	Bio-Rad, München

3.1.7.3 Chemikalien

Agarose	Cambuer, Rockland, USA
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, München
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, München
Bradford Reagenz (Roti-Nanoquant)	Roth, Karlsruhe
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, München
Dapi	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Serva, Heidelberg
DTT	Merck, Darmstadt
Entwickler für Röntgenfilme	Adefo, Dieztenbach
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fixierer für Röntgenfilme	Adefo, Dieztenbach
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Mowiol 4-88	Calbiochem, Hamburg
Phalloidin-TRITC	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostic, Mannheim
SDS	Serva, Heidelberg
Thymidin	Sigma-Aldrich, München
Triton-X 100	Merck, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Fluka, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg und Sigma-Aldrich, München bezogen.

3.1.8 Plasmide

Tabelle 3-5 Liste der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
p50HtrA1	Retrovirales Überexpressionsplasmid für HtrA1 basierend auf dem Vektor p50MXneo; Resistenz Ampicillin/Neomycin	diese Arbeit
p50LV	Retroviraler Vektor p50MXneo ohne <i>Insert</i> ; dient als Leervektorkontrolle; Resistenz Ampicillin/Neomycin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum
plkoLV	Lentiviraler Vektor plko1.puro ohne Insert; dient als Leervektorkontrolle; Resistenz Ampicillin/Puromycin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum
plko shHtrA1 D3	Lentivirales Plasmid, das für eine shRNA gegen HtrA1 kodiert; Resistenz Ampicillin/Puromycin	Linda Trübestein, AG Ehrmann
plko shHtrA1 S8	Lentivirales Plasmid, das für eine shRNA gegen HtrA1 kodiert; Resistenz Ampicillin/Puromycin	Linda Trübestein, AG Ehrmann
pCMVdR8.2	Lentivirales Plasmid, das für gag und pol kodiert, Resistenz Ampicillin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum
pHit60	Retrovirales Plasmid, das für gag und pol kodiert; Resistenz Ampicillin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum
pHitG	Virales Plasmid, das für das Hüllprotein VSV-G kodiert; dient zur Pseudotypisierung von Retro- und Lentiviren; Resistenz Ampicillin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum
MP71	Retrovirales Expressionsplasmid, das für GFP kodiert; dient zur Überprüfung der Transduktionseffizienz; Resistenz Ampicillin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum
pRRLU6CPPTpGKGFP	Lentivirales Expressionsplasmid, das für GFP kodiert; dient zur Überprüfung der Transduktionseffizienz; Resistenz Ampicillin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum

3.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 3-6 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
CDKN1A for	CCTCATCCCGTGTTCTCCTTT
CDKN1A rev	GTACCACCCAGCGGACAAGT
GAPDH for	GCTTGTCATCAATGGAAATCCC
GAPDH rev	AGCCTTCTCCATGGTGG
hHtrA1 for	GCAACTCAGACATGGACTACATC
hHtrA1 rev	GTGTTAATTCCAATCACTTCACCG
HtrA1 seq for 1287-1306	GTAATTCCTGATACCCAGC
HtrA1 seq for 579-597	CCTGCCGTGGTTCATATCG
HtrA1 seq rev 1354-1334	CCATTGATGCTGATTATGACG
HtrA1 seq rev 662-642	AATAAACCCAGACCCACTAGC
HTRA1-ecoRI-as	AAACGAATTCCTATGGGTCAATTTCTTCGGG
HTRA1-NotI-sense	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCACCATGCAGATCCCGCGCGCC
HtrA2 for	GTGGCAGACATCGCAAC
HtrA2 rev	CCATGGCAACAACAAACTCC
HtrA3 for	CGCTACAAGTTCAACTTCATTGC
HtrA3 rev	TGACATGATGAAGCCAGAACC
mdm2 for human	CCTGATCCAACCAATCACCT
mdm2 rev human	TTCCTTTGATGAAAGCCTGG
mHtrA1 for	GTGCTCTCTGGGGCATATATC
mHtrA1 rev	ATGACATCGCTGACGTCATTG
mHtrA2 for	ACATTGGAGTGATGATGCTGA
mHtrA2 rev	GGGAGCCCAGGATAACTTTAT
mHtrA3 for	TTTGGTGGAGGAACTGAAGGC
mHtrA3 rev	GGCCATTGACTTTGACGATGA
m β -Actin for	GATTACTGCTCTGGCTCCTAG
m β -Actin rev	ACTCATCGTACTCCTGCTTGC
p50MXneo3	TAACGGCAGACTTGCTGG
p50MXneo5	ATCCAGCCCTCACTCCTT
pLKO.1puroSeqAS	TGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTAC
pLKO.1puroSeqS	GTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGACG
PPIA_qPCR_fw	CAAATGCTGGACCCAACACA
PPIA_qPCR_rev	CTTGCTGGTCTTGCCATTCC
RibProtL13a for	GGTGGTCGTACGCTGTG
RibProtL13a rev	GGTCCGCCAGAAGATGC
shHtrA1 D3 for	CCGGGATCTCAGGAGCGTATATATTCTCGAGAATATATACGCTCCTGGATCTTTTTG
shHtrA1 D3 rev	AATTCAAAAAGATCTCAGGAGCGTATATATTCTCGAGAATATATACGCTCCTGAGAT C
shHtrA1 S8 for	CCGGCCCAACAGTTTGCGCCATAAACTCGAGTTTATGGCGCAAACCTGTTGGGTTTTT G
shHtrA1 S8 rev	AATTCAAAAACCCAACAGTTTGCGCCATAAACTCGAGTTTATGGCGCAAACCTGTTGGG

3.1.10 Kit-Systeme

ECL Chemilumineszenz-Kit (West Pico)	Perbio Science, Bonn
Nucleobond Xtra Maxi	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin ^(R) RNA II	Machery-Nagel, Düren
<i>QIAamp^(R) DNA Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin PCR purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIA Spin Gel Extraktion Kit</i>	Qiagen, Hilden
QPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
Verso cDNA Kit	Thermo Scientific, Waltham MA, USA

3.1.11 Verbrauchsmaterial

BD Biocoat Collagen I beschichtete Deckglässchen	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon Round Bottom Tube, 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg
CryoTube Vials	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen 24 x 24 mm	Menzel, Braunschweig
Gewebekulturflaschen T25 und T75	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Multikavitätenplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PVDF Membran	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Röntgenfilme	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.12 Geräte

Autoklave	BeliMed, Mühlheim am Inn
Absaugpumpe Typ N811KN.18	KNF Neuberger, Freiburg
CO ₂ -Inkubator HEPA Class 100	Thermo Scientific, Waltham MA, USA
DNA-Gelelektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen
Durchflusszytometer FACScalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad, München
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, GB
Konfokales Mikroskop (TCS-SP5)	Leica Microsystems GmbH, Mannheim
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen

Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
PAGE-Kammern Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
PCR-Gerät Thermocycler Personal	Biometra, Göttingen
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Schott, Mainz
qRT-PCR Gerät Rotor-Gene 3000	Corbett Research, Cambridgeshire, UK
Rotoren: JA25.50 und JLA 9.1000	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Scanner	UMAX, Astra 4000U
Sicherheitswerkbank HERA safe, HS12	Heraeus, Hanau
Spectrometer Genios Pro	Tecan, Crailsheim
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckmann Coulter, Krefeld
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator Gel Imager	Intas, Göttingen
Waagen	Kern, Balingen-Frommern
Western Blot Apparaturen	Bio-Rad, München
Zentrifuge: Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge: Centrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Profuge 10K	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Zentrifuge: Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

3.1.13 Computersoftware

Adobe Reader (R) 8	Adobe System Inc, San Jose, USA
Office 2004 & 2008 for Mac	Microsoft Corporation(R), Redmond, USA
Papers	mekentosj.com
Photoshop(R) 8	Adobe System Inc, San Jose, USA
TScratch	

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellhaltung

Alle verwendeten Zelllinien wurden, soweit nicht anders beschrieben, in DMEM-Vollmedium (Gibco) ggf. mit Zugabe von Antibiotikum zur Erhaltung eines Selektionsdruckes in einem Inkubator bei 37 °C bei 5% CO₂ kultiviert.

3.2.1.2 Zellen auftauen

Im 50 ml Falcon wurden 3 ml DMEM/10% FCS vorgelegt. Die Zellaliquots wurden nacheinander bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, zum Medium getropft und eine Minute inkubiert. Anschließend wurden 6 ml DMEM/10% FCS zugegeben und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen in Medium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche überführt.

3.2.1.3 Anlage von Gefrierkulturen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und von den Flaschenböden gelöst. Währenddessen wurde das Einfriermedium vorbereitet:

- (1) D-MEM mit 50% FCS
- (2) D-MEM mit 22% DMSO (steril filtriert)

Nach Abzentrifugation der Zellen wurde das Zellpellet 2,5 ml Lösung (1) resuspendiert. Anschließend wurden 2,5 ml Lösung (2) zugetropft und die Zellen sofort aliquotiert. Die Zellen wurden bei -80 °C eingefroren und für die langfristige Lagerung in einen Stickstofftank überführt.

3.2.1.4 Zellpassage

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von den Gewebekulturflaschen gelöst (5 min, 37 °C). Die Zellen wurden in DMEM aufgenommen und entsprechend den Versuchsanforderungen auf neue Gewebekulturflaschen aufgeteilt.

3.2.1.5 Gewebekultur von primären embryonalen Mausfibroblasten (MEF)

MEF-Zellen wurden in DMEM-Medium unter Zusatz von 10% FBS, Penicillin/Streptomycin und nicht-essentiellen Aminosäuren bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:3, in höheren Passagen im Verhältnis 1:2 passagiert.

3.2.1.6 Behandlung mit Chemikalien

Um die Auswirkung von verschiedenen Chemikalien auf die HtrA1-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen in 6-Kavitäten-Platten ausgesät, dann 48 h unter Serumentzug weiter inkubiert und abschließend für 6, 24 und 48 h mit den angegebenen Chemikalien und den zugehörigen Lösemittelkontrollen behandelt.

3.2.1.7 Zellen synchronisieren

Um die Expression von HtrA1 in Abhängigkeit vom Zellzyklus zu untersuchen, mussten die untersuchten Zellen zunächst synchronisiert werden. Dazu wurden zwei Methoden verwendet.

3.2.1.7.1 Synchronisation des Zellzyklus durch Behandlung mit Aphidicolin

Aphidicolin ist ein zellpermeables tetrazyklisches Diterpen, das zur Zellzyklussynchronisation eingesetzt wird. Es blockiert den Zellzyklus in der frühen S-Phase durch spezifische Inhibierung der DNA-Polymerasen α und δ in eukaryotischen Zellen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst in 6-Kavitätenplatten ausgesät. Nach 8 h wurden die Zellen mit 1,25 $\mu\text{g/ml}$ Aphidicolin behandelt. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen dreimal mit DMEM-Medium gewaschen und für weitere 8h mit DMEM-Medium inkubiert. Diese Behandlung wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Behandlungszyklus wurden die Zellen zu den gewünschten Zeitpunkten geerntet und für die FACS-Analyse vorbereitet (vgl. 3.2.2.1)

3.2.1.7.2 Doppel-Thymidin-Block

Liegt Thymidin in den Zellen im Überschuss vor, so blockiert es die DNA-Synthese. Dies kann zur Synchronisation der Zellen an der Grenze zwischen G_1 - und S-Phase genutzt werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst in 6-Kavitäten-Platten ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 2 mM Thymidin für 24 h. Danach wurden die Zellen gründlich mit DMEM gewaschen und für 17 h mit DMEM ohne Thymidin inkubiert. Diese Behandlung wurde einmal wiederholt. Im Anschluss daran wurden die Zellen zu den gewünschten Zeitpunkten geerntet und für die weitere Analyse vorbereitet.

3.2.1.8 stabile Transduktion

Für die virale Transduktion der Zielzellen wurde zunächst die Verpackungszelllinie 293T mit Hilfe der CaCl_2 -Methode mit dem viralen Vektor und den Hilfsvektoren kotransfiziert. Dazu wurden am ersten Tag 293T-Zellen gesplittet und so auf einer 10 cm \varnothing -Schale ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50% er-

reichten. Eine 10 cm \varnothing -Schale 293T-Zellen ergibt 10 ml Virusüberstand, der für vier 3 cm \varnothing -Schalen ausreicht. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit folgendem Ansatz:

- 12 μ g viraler Vektor
- 12 μ g Verpackungsplasmid (HGPsyn)
- 5 μ g Hüllplasmid (pHitG)
- 8 μ g pctatrev
- ad 438 μ l ddH₂O

Es wurden 62 μ l 2 M CaCl₂ - Lösung zugegeben und durch pipettieren gemischt. Dann wurden 500 μ l 2x HBS-Puffer langsam zugetropft und es erfolgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung in das Medium der 293T-Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium der 293T-Zellen gewechselt und die Zellen bei 32 °C weiter inkubiert. Die Zielzellen wurden auf eine 6-Kavitätenplatte gesplittet. Am vierten Tag wurde der Virusüberstand von den 293T-Zellen abgenommen, durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 μ m) filtriert, 1:1000 mit Polybren (4 mg/ml) versetzt und jeweils 2,5 ml des Überstandes auf die Zielzellen gegeben. Die Zielzellen werden bei 32°C weiterinkubiert. Zu den 293T-Zellen wurde neues Medium gegeben. Die gleichen Arbeitsschritte wurden am fünften Tag wiederholt.

Die Zielzellen wurden über zwei bis drei Tage kultiviert, dann auf größere Schalen umgesetzt und selektioniert.

3.2.1.9 Selektionierung

Vor der Transduktion wurde eine Verdünnungsreihe der Zielzellen und dem Selektions-Antibiotikum (hier Puromycin oder Geneticin/G418) angesetzt, um die letale Dosis für nicht transduzierte Zellen auszutesten. Nach Umsetzen der transduzierten Zellen wurde mit der Selektionierung begonnen. Nach Abschluss der Selektionierung standen die stabilen Zelllinien für Experimente zur Verfügung.

3.2.1.10 Wachstumskurve

Mit Hilfe von Wachstumskurven sollte das Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien beurteilt werden.

Dazu wurden mindestens sechs Messpunkte aufgenommen. Für jeden Messpunkt wurden zwei 6 cm \varnothing -Schalen der Zelllinien benötigt. Die Zellen wurden im Abstand von 24 bis 72 h geerntet und gezählt. Die Gesamtzellzahl wurde bestimmt und in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

3.2.1.11 2D-Migrationsassay

Der 2D-Migrationsassay wurde wie von Liang und Kollegen angegeben durchgeführt (Liang, Park und Guang, 2007). Die Serummenge wurde für die MEF-Zellen auf 0,1% reduziert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *TScratch* (Gebäck et al., 2009)

3.2.1.12 Bestimmung der Chromosomenzahl (Karyotypisierung)

Die Bestimmung der Chromosomenzahl wurde freundlicherweise von PD Dr. Christian Johannes, Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Exponentiell wachsende Zellkulturen wurden mit N-deacetyl-N-Methylcolchicin (Colcemid; 0,08 mg/ml) für 2 h inkubiert, um mitotische Zellen in hochkondensierten Metaphase-ähnlichen Stadien zu blockieren. Die Zellen wurden anschließend durch Spülen gelöst und in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 120g wurden die Zellsedimente für 10 min mit 5 ml einer 75 mM Kaliumchloridlösung behandelt. Nach weiterer Zentrifugation wurden die geschwollenen Zellen vorsichtig mit 5 ml der Fixierungslösung (Methanol / Essigsäure; 3/1) gemischt, zentrifugiert, und erneut mit der Fixierungslösung gemischt. Die Zellsuspensionen wurden auf gereinigte, feuchte, eiskalte Glasobjektträger getropft, um eine gute Ausbreitung der Chromosomensätze zu erreichen. Nach Lufttrocknung über Nacht wurden die Präparate mit Giemsa-Lösung (5%) gefärbt. Die Chromosomenzahl von intakten Metaphasezellen wurde unter 1000facher Vergrößerung (Ölimmersion) bestimmt.

3.2.2 Protein-biochemische Methoden

3.2.2.1 Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer (FACS)

Nach dem Ernten der Zellen (vgl. 3.2.1.4) wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert. Fixierung erfolgte durch Inkubation der Zellen in 500 µl eiskaltem (-80 °C) Methanol bei -20°C für mindestens eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und durch Zugabe von 5 µl RNaseA (10 mg/ml) und 15 µl Propidiumjodid (2 mg/ml) gefärbt. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer.

3.2.2.2 Gleichzeitige Zellzyklusanalyse und intrazelluläre Antikörperfärbung mit dem Durchflusszytometer

Nach dem Ernten der Zellen (vgl. 3.2.1.4) wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert. Fixierung erfolgte durch Inkubation der Zellen in 500 µl eiskaltem (-80 °C) Methanol bei -20°C für mindestens

eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und mit 2% FCS in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen 30 Min. mit Erstantikörper inkubiert, mit PBS gewaschen und weitere 30 Min. mit Zweitantikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen durch Zugabe von 5 µl RNaseA (10 mg/ml) und 15 µl Propidiumjodid (2 mg/ml) gefärbt. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer.

3.2.2.3 Intrazelluläre Immunfluoreszenz mit dem Durchflusszytometer

Nach dem Ernten der Zellen (vgl. 3.2.1.4) wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert. Fixierung erfolgte durch Zugabe von 100 µl 4% Formaldehyd in PBS/0,5% BSA/NaAzid für 20 Min. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS/0,5% BSA/NaAzid permeabilisiert und danach gewaschen. Dann wurden die Zellen 30 Min. mit Erstantikörper inkubiert, mit PBS gewaschen und weitere 30 Min. mit Zweitantikörper inkubiert. Danach erfolgt die Analyse am Durchflusszytometer.

3.2.2.4 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden zunächst mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Es folgte eine Inkubation mit 0,1% Triton-X 100 in PBS zur Permeabilisierung der Zellmembran. Anschließend wurde für 1 Stunde mit 1% (w/v) BSA in PBS abgesättigt, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurden 100 - 150 µl der Antikörperlösung vorsichtig mit einer Pipette aufgetropft. Nach einstündiger Inkubation wurden die Deckgläschen dreimal kurz, sowie dreimal für 20 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgt für 1 Stunde bei Raumtemperatur wie oben beschrieben. Alle Antikörper und Zusatzfarbstoffe wurden in 1% BSA (w/v)-haltigem PBS gelöst. Wenn der Kern gefärbt wurde enthielt die Zweitantikörperlösung den DAPI Farbstoff, wenn Aktin gefärbt wurde enthielt die Zweitantikörperlösung Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltes Phalloidin aus *Amanita phalloides* (0,1 mg in Methanol). Nach gründlichem Waschen mit PBS (mindestens viermal für 20 Minuten) wurden die Deckgläschen abschließend mit einem luftblasenfreien Tropfen Mowiol (ca. 30 µl) auf Objektträgern eingebettet und über Nacht abgedunkelt an der Luft getrocknet. Die Immunfluoreszenz wird mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCSSP5) ausgewertet.

3.2.2.5 Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung des Reagenz Roti-Nanoquant nach Herstellerangaben.

3.2.2.6 Herstellung cytoplasmatischer Proteinlysate

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Lysepuffer (RBD) versetzt und nach gleichmäßiger Verteilung der Lösung ca. 1 min. inkubiert. Zum mechanischen Ablösen der Zellen von den Platten wurde ein Gummiwischer verwendet und die Zellsuspension anschließend in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (Centrifuge 5417 R, Eppendorf; 10 min., 14 000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Entnahme eines Aliquots zur Gesamtprotein-Konzentrationsbestimmung (ca. 30 µl) bei -80 °C gelagert.

3.2.2.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Laemmli (1970) Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden die Proteine zunächst im weitporigen Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert, beim Übertritt in das engporige Trenngel erfolgt dann die Auftrennung entsprechend ihren Molekulargewichten.

Das Sammelgel wurde mit einem Acrylamidgehalt von 4% angesetzt, die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels wurde je nach zu trennendem Proteingemisch zwischen 8 und 15% variiert.

3.2.2.8 Immunoblot und Detektion

Der Transfer auf eine PVDF-Membran wurde nach dem Elektroblob-Verfahren in einer Halbtrockenzelle (semi-dry Apparatur) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wird die Membran für eine Stunde in Blockierungslösung auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Die Temperatur variiert je nach Antikörper. Anschließend erfolgt die Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden Antikörper auf dem Horizontalschüttler. Die Temperatur variiert ebenfalls je nach Antikörper. Durch dreimaliges Waschen (je 10 min) der Membran in TBST werden die überschüssigen ungebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Es folgt eine Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper wird durch 5maliges Waschen (je 10 min) in TBST entfernt.

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das *Super Pico West-*

Chemilumineszenz-Kit (Pierce) nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurden nacheinander Aufnahmen mit zunehmender Belichtungsdauer angefertigt.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurden grundlegende molekularbiologische Techniken wie die Herstellung kompetenter Zellen, Transformation von Bakterien, DNA- und RNA-Präparation, Restriktion und Ligation sowie die Auftrennung von DNA und RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese und ihre anschließende Aufreinigung angewendet. Die Durchführung dieser Methoden erfolgte nach den jeweiligen Angaben der Hersteller der entsprechenden Enzyme und Kits bzw. nach Maniatis et al., 1989.

3.2.3.1 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mit Hilfe des Verso cDNA Kit nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die vorhandene mRNA durch reverse Transkription mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (auch reverse Transkriptase genannt) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurden Oligo-(dT)-Primer verwendet, die spezifisch an den Poly(A)-Schwanz der eukaryotischen mRNA binden. Parallel wurde eine Kontrolle, die ohne Polymerase behandelt wurde (Minus-RT-Kontrolle), mitgeführt.

3.2.3.2 qRT-PCR

3.2.3.2.1 *Quantitative Real-Time PCR (QPCR)*

Mit Hilfe der quantitativen *real time*-PCR (qRT-PCR) kann man die Amplifikation der Ziel-DNA direkt während der PCR-Reaktion verfolgen. Diese Methode eignet sich gut zur quantitativen Analyse von mRNA, wobei auch schwach exprimierte Gene analysiert werden können. Zunächst wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde ein kurzes Stück der cDNA amplifiziert und detektiert. Dazu wurde das gebildete PCR-Produkt mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff markiert. Der Fluoreszenzfarbstoff, in dieser Arbeit SYBR® Green I, wurde am Ende jedes PCR-Zyklus mit einer geeigneten Optik angeregt und die resultierende Fluoreszenzemission detektiert. Somit konnte aus dem Anstieg der gemessenen Fluoreszenz auf die Zunahme des PCR-Produktes in jedem PCR-Zyklus geschlossen werden.

Für die Quantifizierung der Expression des Zielgens wird die Methode der relativen Quantifizierung gewählt. Dabei wird die Expression des Zielgens relativ zur Expression von Referenzgenen ermittelt (Pfaffl, Horgan & Dempfle 2002). Als Referenzgene dienen nicht-regulierte Gene, sogenannte *Housekeeping genes*, deren mRNA-

Synthese idealerweise in verschiedenen Geweben stabil und unabhängig von experimentellen Behandlungen ist. Die relative Berechnung der Expression des Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen kompensiert Unterschiede in Qualität und Quantität der cDNA-Proben innerhalb eines Ansatzes. Mögliche Variationen der Genexpression aufgrund der experimentellen Bedingungen, die Ziel- und Referenzgen in gleichem Maße beeinflussen, können ebenfalls ausgeglichen werden. Der Prozess der Normalisierung berücksichtigt die unterschiedlichen Effizienzen der PCR-Amplifikationen von Zielgen (E_{Ziel}) und Referenzgen (E_{Referenz}) und transformiert die logarithmischen Rohdaten in lineare Einheiten, welche die normalisierte Expression angeben.

Die C(T)-Werte der Proben werden mit Hilfe des Programms RotorGene bestimmt. Dafür wird die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzkurven ausgewählt, die durchschnittliche Hintergrundfluoreszenz der Zyklen zwei bis zehn subtrahiert und der Schwellenwert der Fluoreszenz auf 0,025 gesetzt. Der C(T)-Wert gibt den Zyklus an, an dem die Fluoreszenz in der Probe den Schwellenwert erreicht, wobei umso weniger Zyklen zum Erreichen des Schwellenwerts benötigt werden, je mehr Template-cDNA in der Probe am Anfang der QPCR-Reaktion vorhanden ist.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit Hilfe der *Software Q-Gene* (Muller et al., 2002; Simon, 2003). Zunächst wird die normalisierte Expression (NE) einer Serie mit

n Wiederholungen mit Hilfe von Formel 3-1 $NE = \frac{(E_{\text{Referenz}})^{CT_{\text{Referenz}}}}{(E_{\text{Ziel}})^{CT_{\text{Ziel}}}}$ Formel 3-1 durch n

paarweise Vergleiche von CT_{Referenz} mit einem CT_{Ziel} derselben Serie berechnet.

$$\text{Formel 3-1 } NE = \frac{(E_{\text{Referenz}})^{CT_{\text{Referenz}}}}{(E_{\text{Ziel}})^{CT_{\text{Ziel}}}}$$

Dann werden die Mittelwerte und die Standardfehler für die Referenz und das Zielgen berechnet und die mittlere normalisierte Expression (MNE) über folgende Gleichung ermittelt:

$$\text{Formel 3-2 } MNE = \frac{(E_{\text{Referenz}})^{CT_{\text{Referenz}, \text{Mittelwert}}}}{(E_{\text{Ziel}})^{CT_{\text{Ziel}, \text{Mittelwert}}}}$$

Der Standardfehler der mittleren normalisierten Expression (SF_{MNE}) wird schließlich mit Hilfe der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung berechnet:

$$\text{Formel 3-3 } SE_{MNE} = MNE \cdot \left[(\ln(E_{\text{Ziel}}) \cdot SE_{CT_{\text{Ziel}, \text{Mittelwert}}})^2 + (\ln(E_{\text{Referenz}}) \cdot SE_{CT_{\text{Referenz}, \text{Mittelwert}}})^2 \right]^{1/2}$$

Mit Hilfe dieser Berechnungen können die Rohdaten der QPCR evaluiert und statistisch analysiert werden.

3.2.3.2.2 Durchführung der quantitativen Real Time-PCR

Alle Ansätze wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei jedem Primerpaar wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt.

Ansatz		Programm	
Template - cDNA	20 ng	15 min bei 95°C	
SYBER Green-Mix	12,5 µl	15 sec bei 95°C	} 40 Zyklen
25 mM dNTPs	10 µl	30 sec bei 55°C	
10 pmol/µl Primer forward	1 µl	30 sec bei 72°C	
10 pmol/µl Primer reverse	1 µl	120 sec bei 40°C	
Aqua bidest	ad 25 µl	60 sec bei 50°C	
		5 sec bei 50-99°C Schmelzkurve	
		Kühlen bei 4°C	

Dieses Protokoll wurde für sämtliche zu untersuchenden Proben verwendet.

3.2.3.3 qRT-PCR-Primer

Die *Primer*, die für QPCR-Reaktionen eingesetzt werden, wurden mit Hilfe der *Online*-Datenbanken *qPrimerDepot Human* (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>) und *qPrimerDepot Mouse* (<http://mouseprimerdepot.nci.nih.gov/>) ausgewählt (Cui, Taub und Gardener, 2007). Die *Primer* sollen dabei folgende Bedingungen erfüllen:

- T_m der *Primer* zwischen 58°C und 60°C
- Maximal 2°C Temperaturdifferenz zwischen den T_m des *sense*- und *antisense*-*Primers*
- G/C-Gehalt zwischen 40% und 60%
- *Primer*-Länge zwischen 19 und 21 nt
- T_m des Amplicons zwischen 78°C und 87°C
- Länge des Amplicons zwischen 90 und 200 bp-
- *Primer* sollen möglichst weit am 3'-Ende liegen und möglichst einen Exon-IntronÜbergang überspannen

Die *Primer*-Paare werden durch Datenbanksuche (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) auf Spezifität hinsichtlich des Zielgens untersucht.

3.2.3.4 cDNA-Microarray

Der cDNA-*Microarray* wurde durch PD Dr. Ludger Klein-Hitpass, Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Es wurde ein *GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array*

verwendet.

3.2.3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden wird als Auftragsarbeit von der Firma GATC durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Expression der HtrA-Proteine

Die Auswirkungen einer reduzierten HtrA1-Expression auf verschiedene Zellprozesse sollten anhand von zwei Modellsystemen charakterisiert werden. Als Modellsysteme dienten primäre embryonale Fibroblasten aus HtrA1-*knockout*-Mäusen (zur Verfügung gestellt durch Prof. Alan Clarke, Cardiff, UK) sowie durch virale Transduktion erhaltene shRNA-Derivate der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW480 (vgl. 3.2.1.8). In diesen Zellen sollte zunächst die Expression von HtrA1, HtrA2 und HtrA3 untersucht werden.

4.1.1 Primäre embryonale Mausfibroblasten

Die Expression von HtrA1 wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Es sollte überprüft werden, ob die HtrA1-Expression in Fibroblasten aus HtrA1-*knockout*-Mäusen im Vergleich zu Zellen aus HtrA1-Wildtyp-Mäusen reduziert ist.

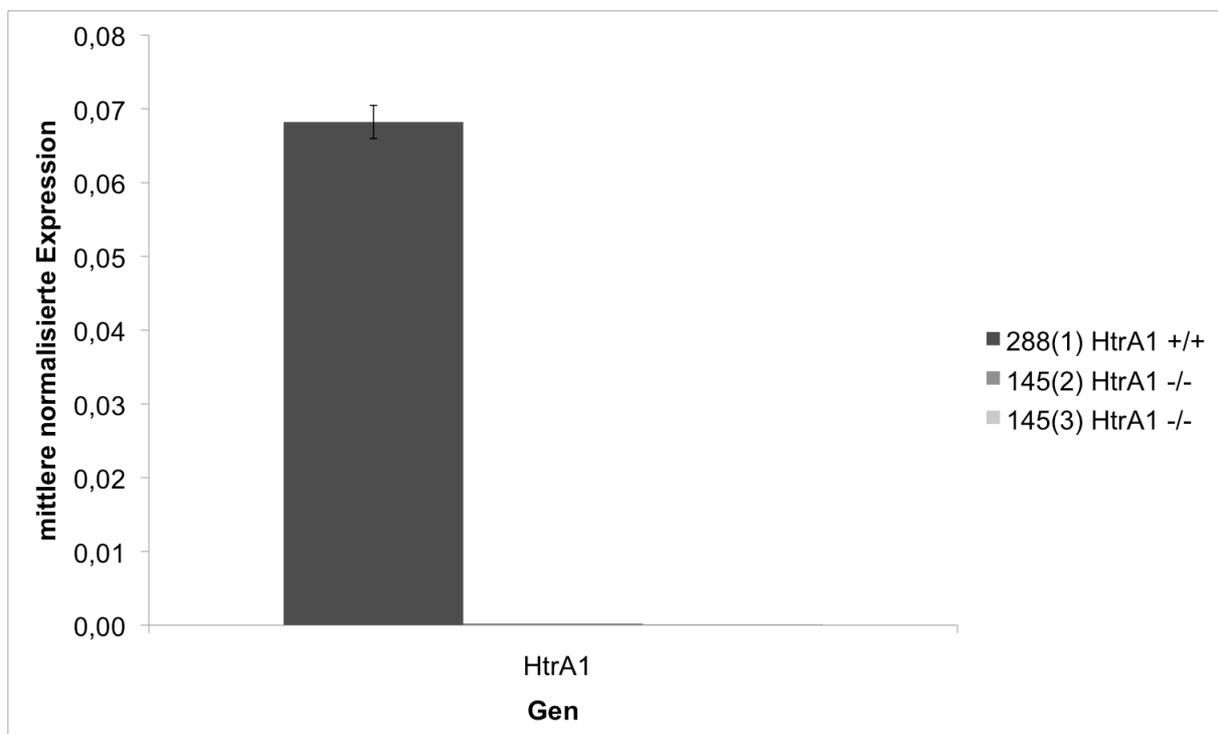


Abb. 4-1 RNA-Expression von HtrA1 in HtrA1-Wildtyp- und HtrA1-*knockout*-Fibroblasten

Es wurde die HtrA1-RNA-Expression in den beiden HtrA1-*knockout*-Fibroblastenlinien 145(2) HtrA1-/- und 145(3) HtrA1-/- mit der HtrA1-Expression in der HtrA1-Wildtyp-Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1+/+ verglichen.

Dazu wurde die RNA-Expression mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt (vgl. 3.2.3.2). Abb. 4-1 zeigt deutlich, dass in den beiden HtrA1-*knockout*-Fibroblastenzelllinien 145(2) HtrA1 *-/-* und 145(3) HtrA1 *-/-* im Vergleich zur Wildtyp-Fibroblastenzelllinie 288(1) HtrA1 *+/+* kaum noch HtrA1-Expression nachzuweisen ist.

Die Proteinexpression wurde mittels WesternBlot (vgl. 3.2.2.8) bestimmt.

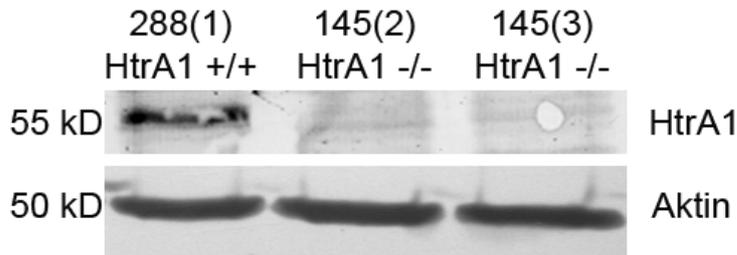


Abb. 4-2 Proteinexpression von HtrA1 in HtrA1-Wildtyp- und HtrA1-*knockout*-Fibroblasten

Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Gesamtproteinlysate. Es wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die PDZ-Domäne von HtrA1 verwendet. Als Beladungskontrolle diente Aktin.

Abb. 4-2 zeigt, dass die HtrA1-Proteinexpression in den beiden Fibroblastenlinien 145(2) HtrA1-*-/-* und 145(3) HtrA1-*-/-* im Vergleich zur Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1-*+/+* deutlich reduziert ist. Die Aktin-Expression wurde als Kontrolle untersucht und ist in allen Zelllinien gleich.

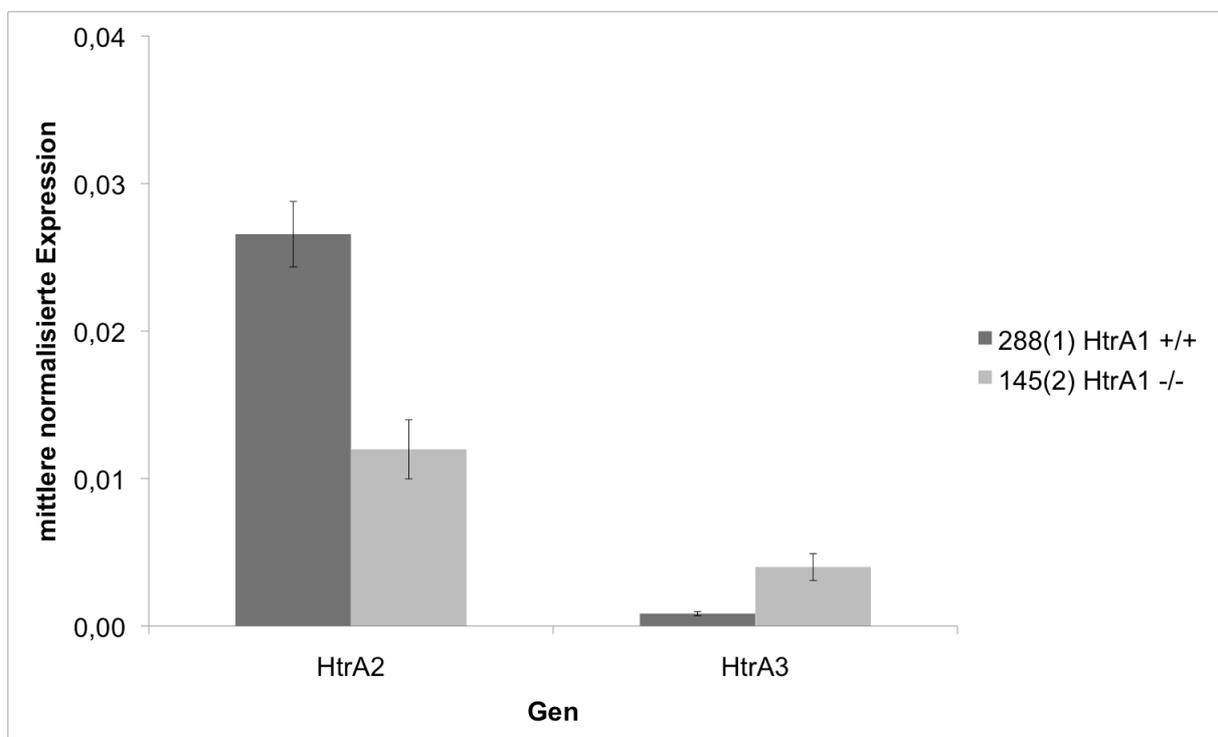


Abb. 4-3 RNA-Expression von HtrA2 und HtrA3 in HtrA1-Wildtyp- und HtrA1-*knockout*-Fibroblasten

Es wurde die HtrA2- und HtrA3-RNA-Expression in der HtrA1-*knockout*-Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1-*-/-* mit der Expression in der HtrA1-Wildtyp-Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1-*+/+* verglichen.

Des Weiteren sollte die HtrA2- und HtrA3-Expression auf RNA-Ebene in den Fibroblastenlinien verglichen werden, um zu untersuchen, ob diese durch den HtrA1-*knockout* beeinflusst werden. Abb. 4-3 zeigt, dass die Expression von HtrA2 in der Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1^{-/-} gegenüber der Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1^{+/+} um mehr als die Hälfte reduziert ist. Die Expression von HtrA3 dagegen ist in der Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1^{-/-} im Vergleich mit der Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1^{+/+} um das Vierfache erhöht. Die Proteinexpression konnte aufgrund fehlender spezifischer Antikörper nicht überprüft werden.

4.1.2 Kolonkarzinomzelllinie SW480

Auch in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 und den zugehörigen shHtrA1-Derivaten sollte die HtrA1-Expression auf RNA- und Protein-Ebene untersucht werden, um den Erfolg des shRNA-*knockdowns* zu überprüfen.

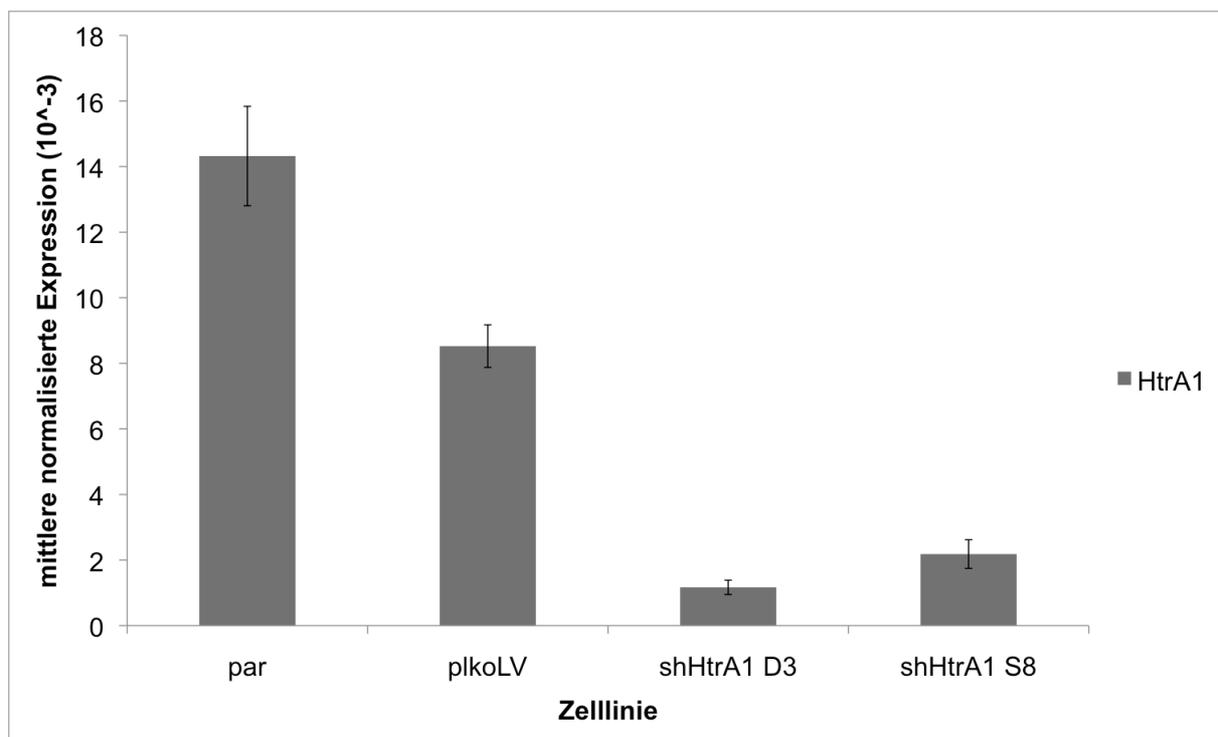


Abb. 4-4 RNA-Expression von HtrA1 in SW480-Zelllinien

Es wurde das RNA-Expressionsniveau von HtrA1 in den durch stabile Transduktion hergestellten shHtrA1-Zelllinien SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 mit dem Expressionsniveau in der Leervektorkontrolle SW480 plkoLV und der parental Zelllinie SW480 verglichen.

Die RNA-Expression wurde mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt (vgl. 3.2.3.2). Wie aus Abb. 4-4 ersichtlich, ist die HtrA1-Expression in den Zelllinien SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 (vgl. Tabelle 3-2) um ca. 93% bzw. 86% im Vergleich zu SW480 parental reduziert. Im Vergleich zur Leervektorkontrolle SW480 plkoLV beträgt die Reduktion ca. 88% bzw. 78%. Allerdings zeigt auch die Leervektorkontrolle

im Vergleich zur parentalen Zelllinie eine Reduktion der HtrA1-Expression um ca. 38%.

Die Proteinexpression von HtrA1 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (vgl. 3.2.2.3), da ein Nachweis mittels WesternBlot aufgrund der höheren Nachweisgrenze nicht möglich war.

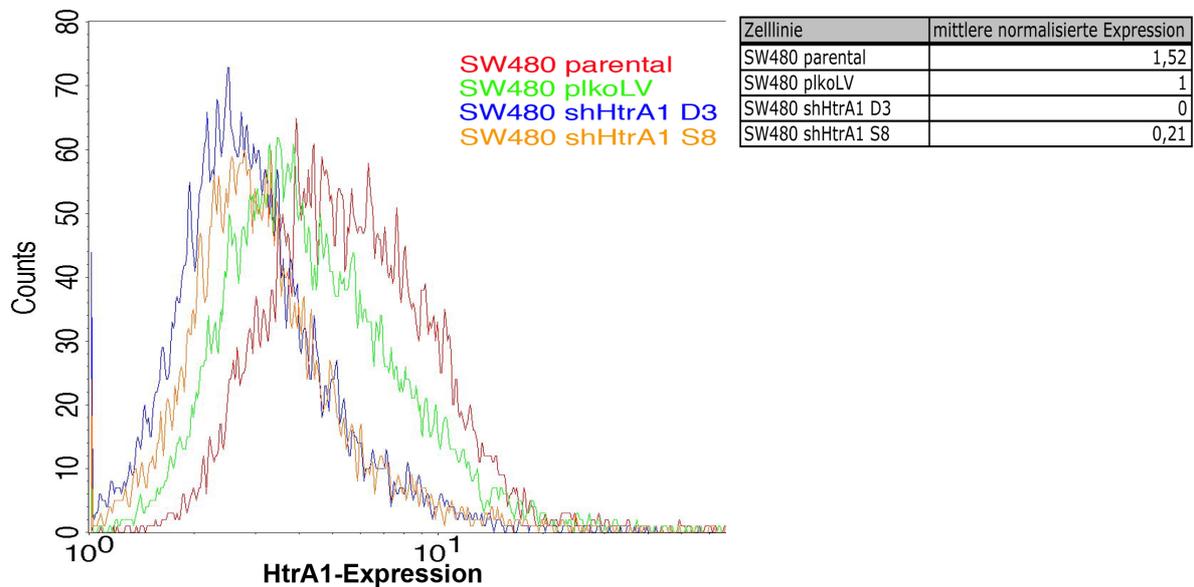


Abb. 4-5 Protein-Expression von HtrA1 in SW480-Zelllinien

Die Protein-Expression von HtrA1 in der parentalen Zelllinie SW480 (rot) wurde mit dem Proteinexpressionsniveau in den stabil transduzierten Zelllinien SW480 plkoLV (grün), SW480 shHtrA1 D3 (blau) und SW480 shHtrA1 S8 (orange) verglichen.

Abb. 4-5 zeigt, dass die Expression von HtrA1 in der Leervektorkontrolle SW480 plkoLV im Vergleich zur parentalen Zelllinie um ca. ein Drittel reduziert ist. In der Zelllinie SW480 shHtrA1 D3 ist HtrA1 gar nicht und in SW480 shHtrA1 S8 nur noch sehr schwach nachweisbar ist.

Zusätzlich wurde die RNA-Expression von HtrA2 und HtrA3 untersucht, um einen Zusammenhang zwischen der Expression von HtrA1, HtrA2 und HtrA3 zu überprüfen.

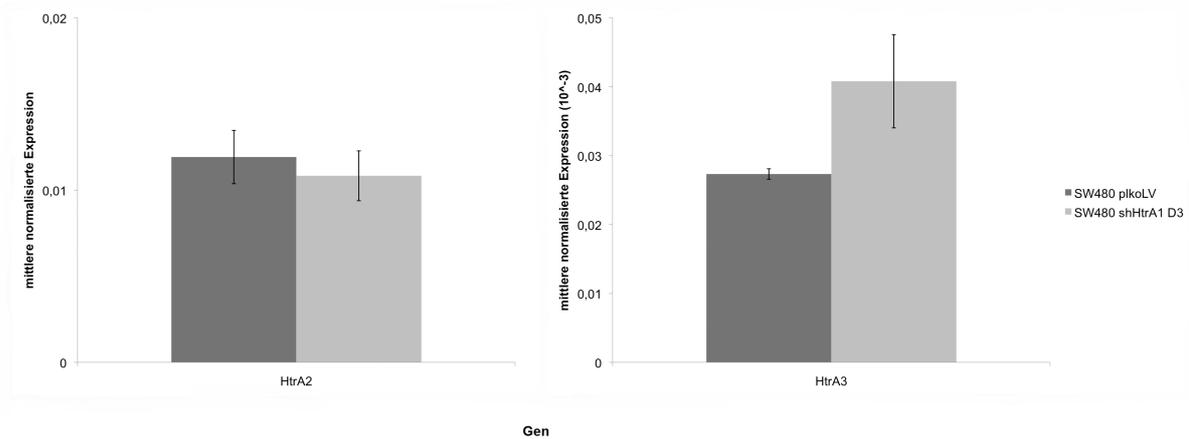


Abb. 4-6 HtrA2- und HtrA3-RNA-Expression in SW480

Verglichen wurden die Leervektorkontrolle SW480 plkoLV und die SW480 shHtrA1 D3-Zelllinie. Der linke Teil der Abbildung zeigt die HtrA2-Expression, der rechte Teil die wesentlich geringere HtrA3-Expression.

Abb. 4-6 zeigt, dass die HtrA2-Expression in der shHtrA1-Zelllinie im Vergleich zur Leervektorkontrolle nahezu unverändert bleibt. Die HtrA3-Expression dagegen steigt in der shHtrA1-Zelllinie um ca. 50%. Bei einem Verlust der HtrA1-Expression steigt die HtrA3-Expression also sowohl in primären wie auch in Krebszellen an.

4.2 HtrA1 ist extrazellulär und intrazellulär lokalisiert

Die Lokalisation von HtrA1 sollte mittels Immunfluoreszenzfärbung in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 untersucht werden (vgl. 3.2.2.4). Dazu wurden die Zellen auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen ausgesät und fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte dann mit Dapi (gegen den Kern), TRITC-gekoppeltem Phalloidin (gegen Aktin) und einem monoklonalen HtrA1-Antikörper in Kombination mit einem Alexa488-gekoppelten Zweitantikörper. In der Kolonkarzinomzelllinie SW480 parental konnte mit diesem Antikörper kein HtrA1 nachgewiesen werden. Deshalb wurde zur Untersuchung der Lokalisation die mit viraler Transduktion (vgl. 3.2.1.8) hergestellte Überexpressionszelllinie SW480 p50HtrA1 sowie als Kontrolle die Leervektorzelllinie SW480 p50LV verwendet.

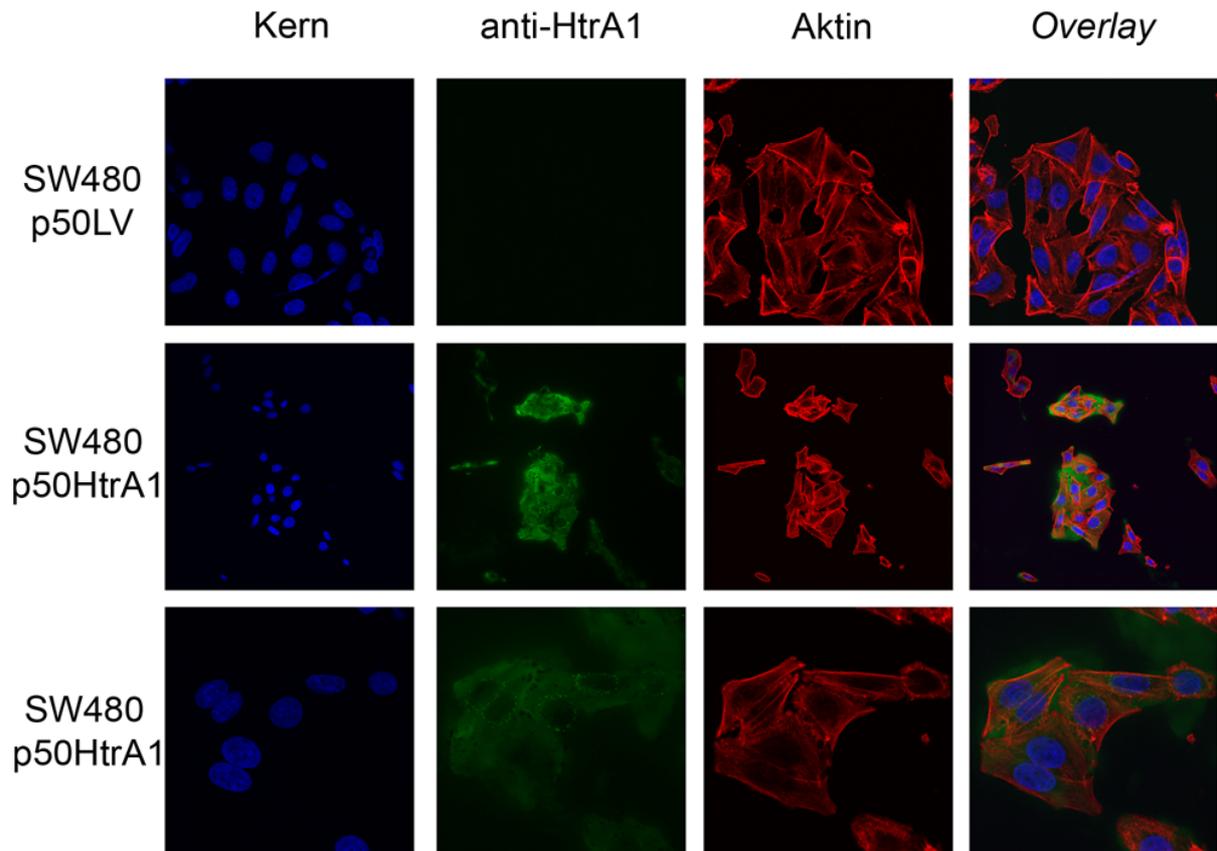


Abb. 4-7 Lokalisation von HtrA1 in der Überexpressionszelllinie SW480 p50HtrA1

Die Zelllinien SW480 p50LV (obere Reihe) und SW480 p50HtrA1 (mittlere und untere Reihe) wurden auf Collagen-beschichteten Deckgläschen ausgesät und fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit Dapi gegen den Kern (blau), einem monoklonalen Antikörper gegen HtrA1 und Alexa488-gekoppeltem Zweitantikörper (grün) sowie TRITC-gekoppeltem Phalloidin für eine Aktin-Färbung (rot).

Abb. 4-7 zeigt, dass HtrA1 in der Überexpressionszelllinie SW480 p50HtrA1 vor allem außerhalb der Zelle lokalisiert ist. Dabei ist die Färbung in den Bereichen zwischen einzelnen Zellen intensiver als in den Bereichen außerhalb der Zellhöfe. Innerhalb der Zelle scheint HtrA1 verstärkt in Vesikeln rund um den Kern lokalisiert zu sein.

4.3 Konsequenzen des knockouts von HtrA1 in primären embryonalen Mausfibroblasten

Da HtrA1 mehrfach als Tumorsuppressor postuliert wurde (Baldi et al., 2002; Shridhar et al., 2002), sollten die Auswirkungen des *knockouts* von HtrA1 auf verschiedene Zellmerkmale und -prozesse, die mit der malignen Transformation in Zusammenhang stehen, untersucht werden. Dazu gehörte der DNA-Gehalt, die Zellteilung, sowie das Wachstums-, Proliferations- und Migrationsverhalten.

4.3.1 Einfluss auf den DNA-Gehalt

Zunächst wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Propidiumjodid-Färbung über mehrere Passagen am Durchflusszytometer bestimmt (vgl. 3.2.2.1). Dabei wurde festgestellt, dass die Fibroblastenlinien 145(2) HtrA1^{-/-} und 145(3) HtrA1^{-/-} nach einigen Passagen (Passage > 10) eine deutliche Verschiebung des DNA-Gehalts von 2n (einfacher Chromosomensatz) nach 4n (doppelter Chromosomensatz) zeigen (Abb. 4-8). Die Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1^{+/+} zeigt diesen Effekt nicht.

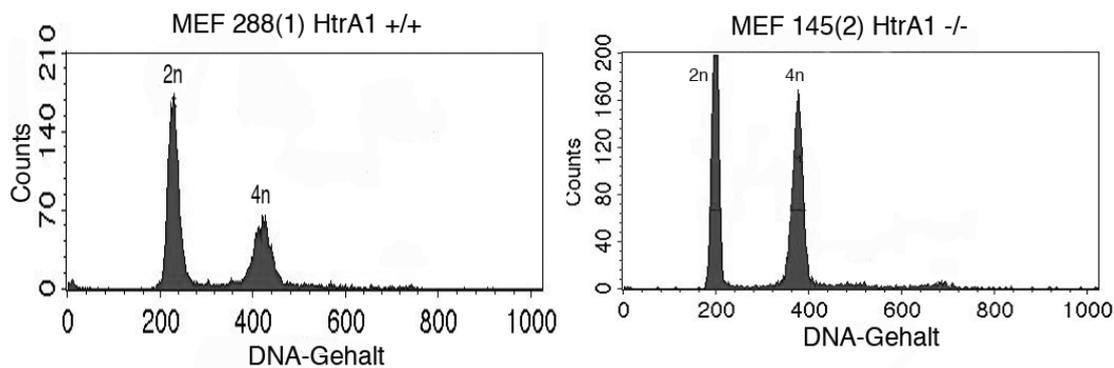


Abb. 4-8 Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in primären Mausfibroblasten
Der DNA-Gehalt der beiden primären Mausfibroblastenlinien 288(1) HtrA1^{+/+} und 145(2) HtrA1^{-/-} wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Der Peak bei 200 entspricht dabei einem einfachen Chromosomensatz (2n), der Peak bei 400 entspricht einem doppelten Chromosomensatz (4n).

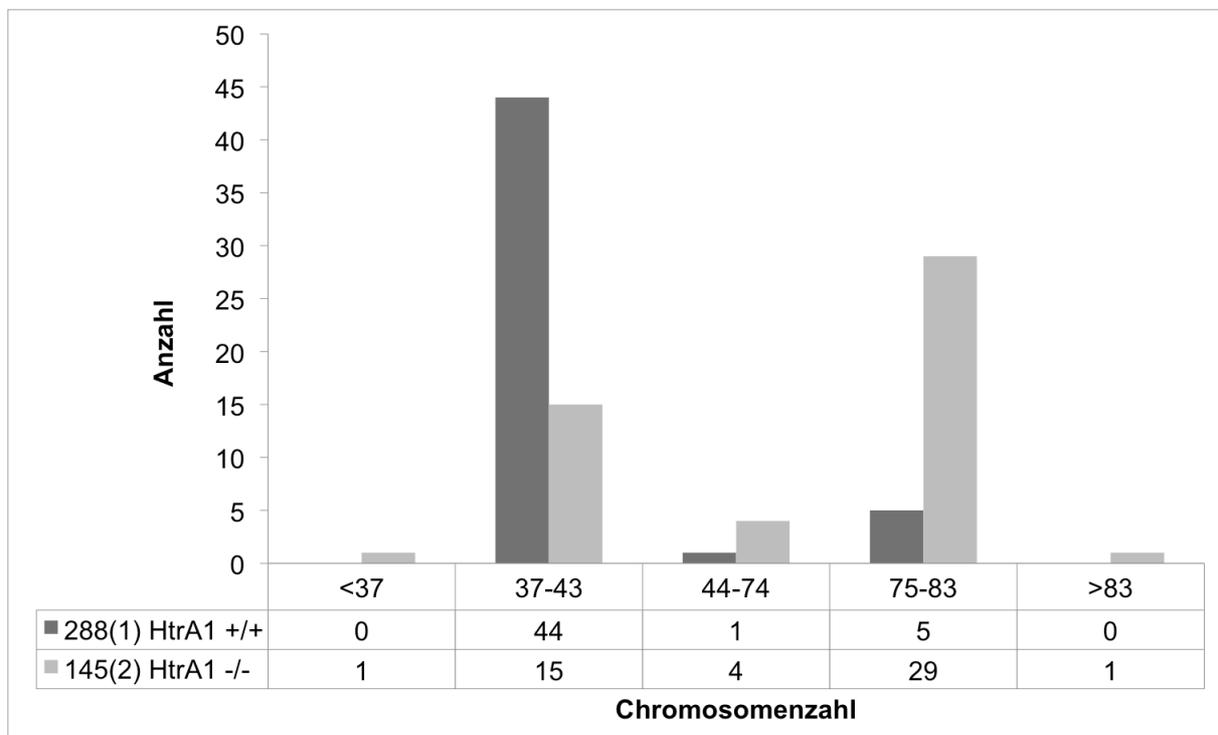


Abb. 4-9 Bestimmung der Chromosomenzahl der Mausfibroblastenlinien in 50 ausgewählten Mitosen

Die Zellen der beiden Fibroblastenlinien wurden mit Colcemid behandelt und fixiert. Nach anschließender Aufarbeitung wurde dann die Anzahl der Chromosomen in jeweils 50 Mitosen bestimmt. 40 Chromosomen entsprechen dabei einem normalen Chromosomensatz.

Im Anschluss daran wurde eine Karyotypisierung der Fibroblastenlinien 288(1) HtrA1+/+ und 145(2) HtrA1-/- vorgenommen (vgl. 3.2.1.12). Die Karyotypisierung wurde von Dr. Christian Johannes, Universität Duisburg-Essen, durchgeführt.

Auch die Bestimmung der Chromosomenzahl in den beiden Fibroblastenlinien (vgl. Abb. 4-9) zeigt, dass die Zellen der Linie 145(2) HtrA1-/- zu großen Teilen einen doppelten Chromosomensatz mit ca. 80 Chromosomen besitzen. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen der Linie 288(1) HtrA1+/+ in 80% der Fälle einen normalen Chromosomensatz mit 40 Chromosomen.

4.3.2 Spindelanomalien

Um die Ursache für die Polyploidie in den HtrA1-*knockout* Zellen weiter zu untersuchen, sollten die Mitosespindeln der Zellen immunzytochemisch angefärbt werden (vgl. 3.2.2.4) und mit dem konfokalen Lasermikroskop analysiert werden. Um genügend Zellen in der Mitose vorzufinden, mussten die Zellen zuvor mit Aphidicolin synchronisiert (vgl. 3.2.1.7.1) und dann zu den entsprechenden Zeitpunkten fixiert werden. Anschließend wurden Kern, α -Tubulin und Aktin angefärbt.

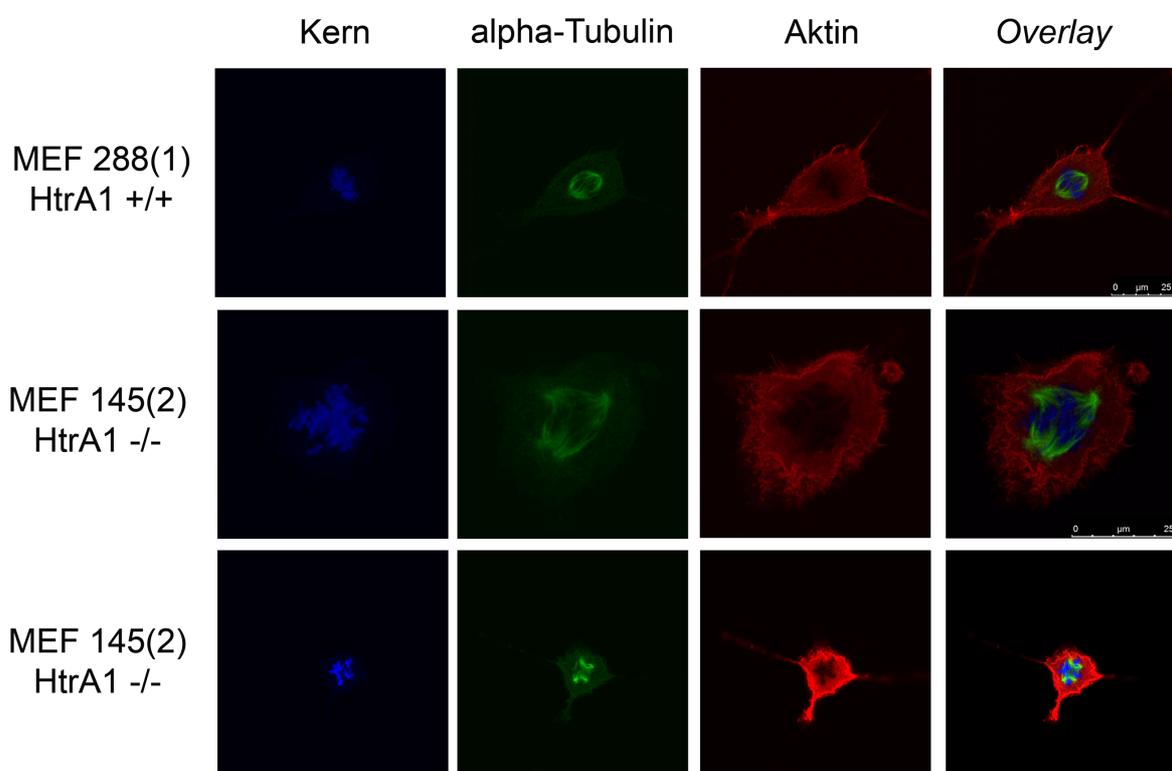


Abb. 4-10 Spindelfärbungen

Die Zellen der Fibroblastenlinien 288(1) HtrA1+/+ und 145(2) HtrA1-/- wurden synchronisiert, fixiert und mit Dapi gegen den Kern (blau), anti- α -Tubulin und anti-Maus-Alexa488-Zweitantikörper (grün) und TRITC-gekoppeltem Phalloidin gegen Aktin (rot) gefärbt. Die obere Reihe zeigt beispielhaft eine Zelle der Linie 288(1) HtrA1+/+ in der Metaphase der Mitose. Die beiden unteren Reihen zeigen beispielhaft jeweils eine Zelle der Linie 145(2) HtrA1-/- in der Metaphase der Mitose.

Die Anfärbung der Mitosespindeln (grün) in Abb. 4-10 zeigt, dass viele Zellen der Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1^{-/-} (untere beiden Reihen) nicht zwei Spindelpole sondern mindestens vier Spindelpole aufweisen. Die Kernfärbung (blau) zeigt außerdem, dass sich die Chromosomen in den HtrA1-*knockout*-Zellen anders an der Spindel aufreihen als in den HtrA1-Wildtyp-Zellen 288(1) HtrA1^{+/+} (Abb. 4-10).

Anschließend wurden zur statistischen Auswertung jeweils 30 Mitosen am Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich der Polarität ihrer Spindeln untersucht. Zellen der Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1^{+/+} zeigten fast ausschließlich bipolare Spindeln. Zellen der Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1^{-/-} zeigten dagegen in ungefähr der Hälfte aller Zellen multipolare Spindeln. Dieser Unterschied ist laut *Student's t*-Test mit einem p-Wert, der kleiner als 0,001 ist, statistisch höchst signifikant (vgl. Abb. 4-11).

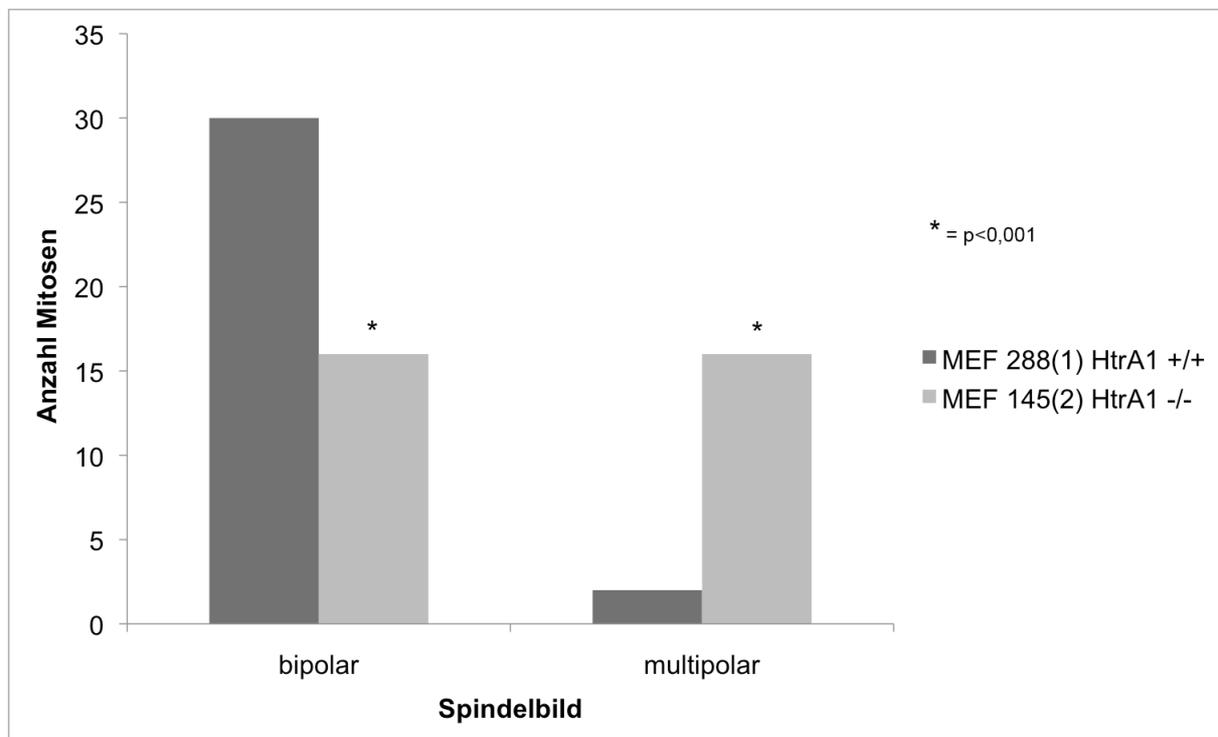


Abb. 4-11 Auszählung der Anzahl der Zellen mit bipolaren und multipolaren Spindeln

Um zu überprüfen, ob der Unterschied in der Häufigkeit der multipolaren Spindeln zwischen den *knockout*- und den Wildtypzellen statistisch signifikant ist, wurden jeweils 30 Mitosen analysiert.

4.3.3 Numerische Abberation der Centrosomen

Eine Ursache für die Bildung multipolarer Spindeln kann eine numerische Abberation der Centrosomenanzahl sein (Nigg, 2002). Deshalb sollten synchronisierte Zellen hinsichtlich ihrer Centrosomenzahl in der Mitose untersucht werden. Für die immunzytochemische Färbung wurde ein Antikörper gegen γ -Tubulin aus Maus verwendet. Abb. 4-12 zeigt, dass in den Zellen der Wildtyp-Linie nur zwei Centrosomen nachweisbar sind. In den Zellen der beiden HtrA1-*knockout*-Linien dagegen sind vier oder

mehr Centrosomen vorhanden.

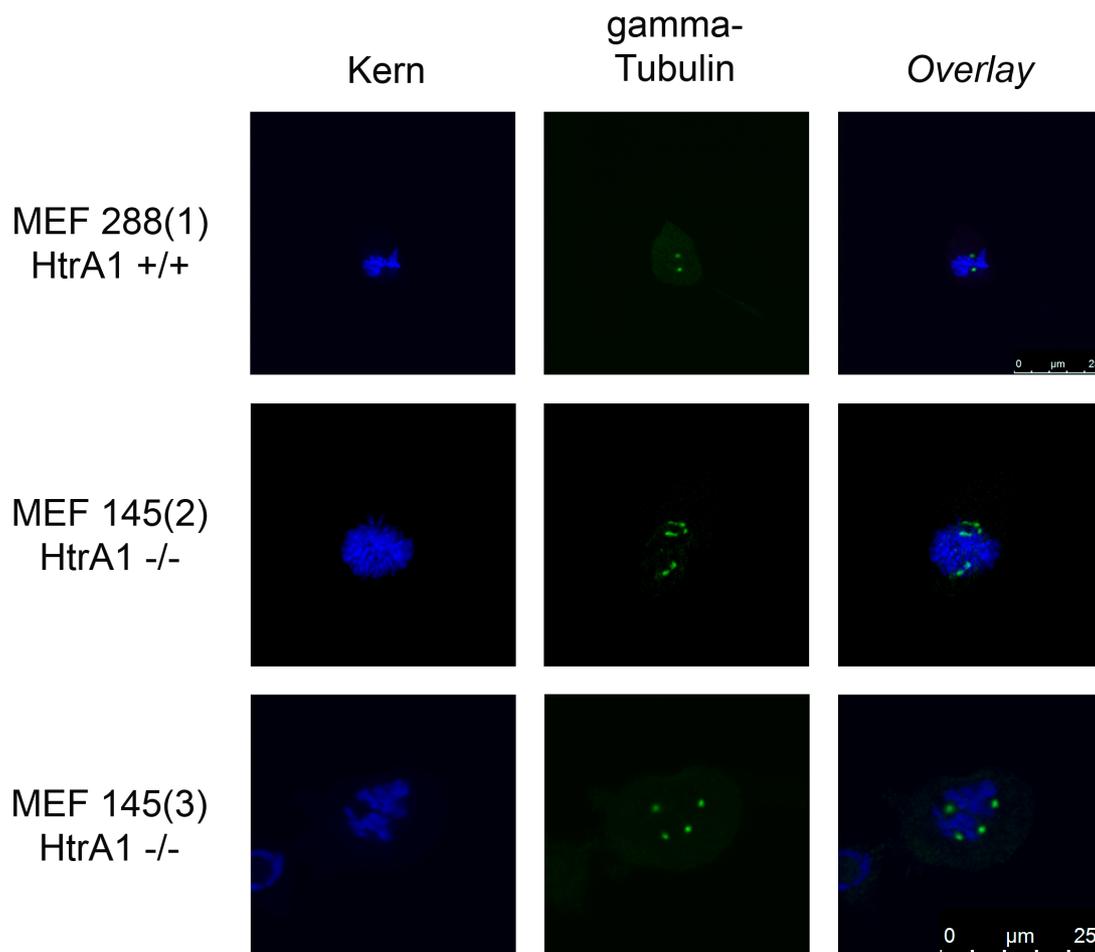


Abb. 4-12 Centrosomenfärbung

Die Fibroblastenlinien 288(1) HtrA+/+ (obere Reihe), 145(2) HtrA1-/- (mittlere Reihe) und 145(3) HtrA1-/- (untere Reihe) wurden auf Collagenbeschichteten Deckgläschen ausgesät, synchronisiert und zum entsprechenden Zeitpunkt in der Mitose fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit Dapi gegen Kern bzw. Chromosomen (blau) und einem anti- γ -Tubulin-Antikörper in Kombination mit einem Alexa488-gekoppelten Zweitantikörper (grün).

Für eine statistische Auswertung wurden jeweils 50 Mitosen der Fibroblastenlinien 288(1) HtrA1+/+, 145(2) HtrA1-/- und 145(3) HtrA1-/- hinsichtlich ihrer Centrosomenanzahl ausgewertet (Abb. 4-13). In den beiden HtrA1-*knockout*-Linien 145(2) HtrA1-/- und 145(3) HtrA1-/- weisen ca. 40% der Zellen in der Mitose mehr als zwei Centrosomen auf, während die HtrA1-Wildtyp-Zelllinie 288(1) HtrA1+/+ nur in ungefähr 15% der Zellen mehr als zwei Centrosomen aufweist. Dieser Unterschied ist laut *Student's t*-Test mit einem p-Wert kleiner als 0,01 für 145(2) HtrA1-/- und einem p-Wert kleiner 0,005 für 145(3) HtrA1-/- statistisch signifikant.

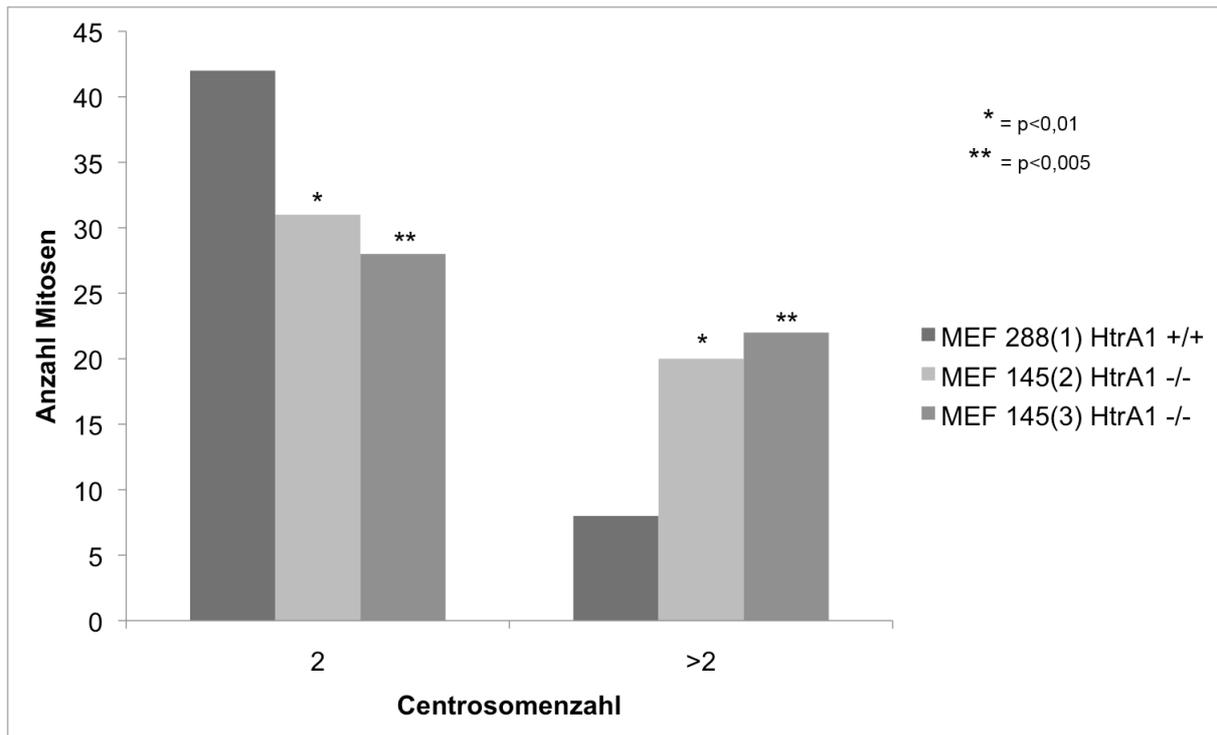


Abb. 4-13 Centrosomenanzahl in 50 Mitosen der HtrA1-Wildtyp- und HtrA1-knockout-Fibroblastenlinien

Um zu überprüfen, ob der Unterschied in der Centrosomenanzahl zwischen HtrA1-Wildtyp- und HtrA1-knockout-Linien statistisch signifikant ist, wurden jeweils 50 Mitosen am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.3.4 Einfluss auf das Proliferationsverhalten

Der *knockout* eines Tumorsuppressorgens kann Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Zellen haben. Deshalb sollte dieses für die HtrA1-knockout-Zelllinien untersucht werden. Aufgrund des veränderten DNA-Gehalts konnte kein käuflicher Proliferationsassay, der auf der Änderung des Gesamt-DNA-Gehalts der untersuchten Population basiert, verwendet werden. Das Proliferationsverhalten wurde daher mit Hilfe von Wachstumskurven untersucht (vgl. 3.2.1.10).

Abb. 4-14 zeigt deutlich, dass die HtrA1-knockout-Linie 145(2) HtrA1-/- wesentlich schneller proliferiert als die HtrA1-Wildtyp-Linie 288(1) HtrA1+/+. In den ersten 24h ist das Wachstumsverhalten noch sehr ähnlich. Der Unterschied im Wachstumsverhalten wird im Zeitraum von 24 bis 72 h deutlicher und ist nach 72 bis 96 h am größten. Danach flachen beide Kurven etwas ab und erreichen nach 168 h ihr Maximum. Danach fallen beide Kurven wieder leicht ab. Die Gesamtzellzahl liegt nach 168 h für die Linie 288(1) HtrA+/+ bei ca. $1,6 \cdot 10^6$ Zellen und für die Linie 145(2) HtrA1-/- bei ca. $3,8 \cdot 10^6$ Zellen. Ein ähnliches Ergebnis zeigt auch der Vergleich der Wachstumskurven der Linien 288(1) HtrA1+/+ und 145(3) HtrA1-/- (Daten nicht gezeigt).

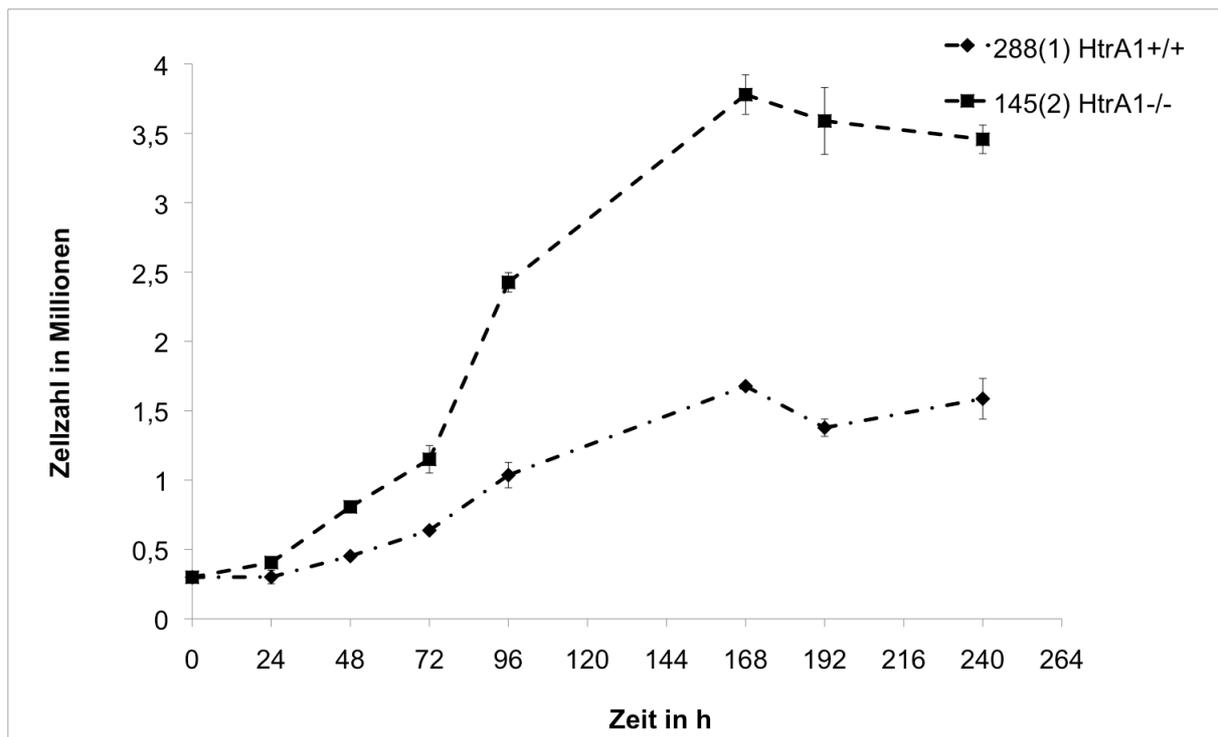


Abb. 4-14 Wachstumskurven der Fibroblastenlinien 288(1) HtrA1+/+ und 145(2) HtrA1-/-
 Das Wachstumsverhalten der HtrA1-Wildtyp- und HtrA1-*knockout*-Fibroblastenlinie wurde mittels Wachstumskurve bestimmt. Dazu wurden 300 000 Zellen in 6 cm-Ø-Schalen ausgesät und alle 24 h gezählt.

Des Weiteren ließ sich bei der Kultivierung der embryonalen Mausfibroblasten beobachten, dass die Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1+/+ bis zur Passage 12 teilungsfähig ist. Danach gehen die Zellen in einen seneszenzähnlichen Ruhezustand über. Die Fibroblastenlinien 145(2) HtrA1-/- und 145(3) HtrA1-/- dagegen lassen sich über Passage 18 hinaus weiter kultivieren. Ein quantitativer Seneszenzassay, der auf dem Nachweis einer erhöhten β -Galactosidase-Aktivität beruht, konnte für diese Zellen nicht etabliert werden.

4.3.5 Einfluss auf das Migrationsverhalten

Neben dem Einfluss auf das Proliferationsverhalten kann der *knockout* eines Tumorsuppressorgens auch Einfluss auf das Migrationsverhalten haben. Dieses sollte daher mit Hilfe eines 2D-Wundheilungs-Assays untersucht werden (vgl. 3.2.1.11).

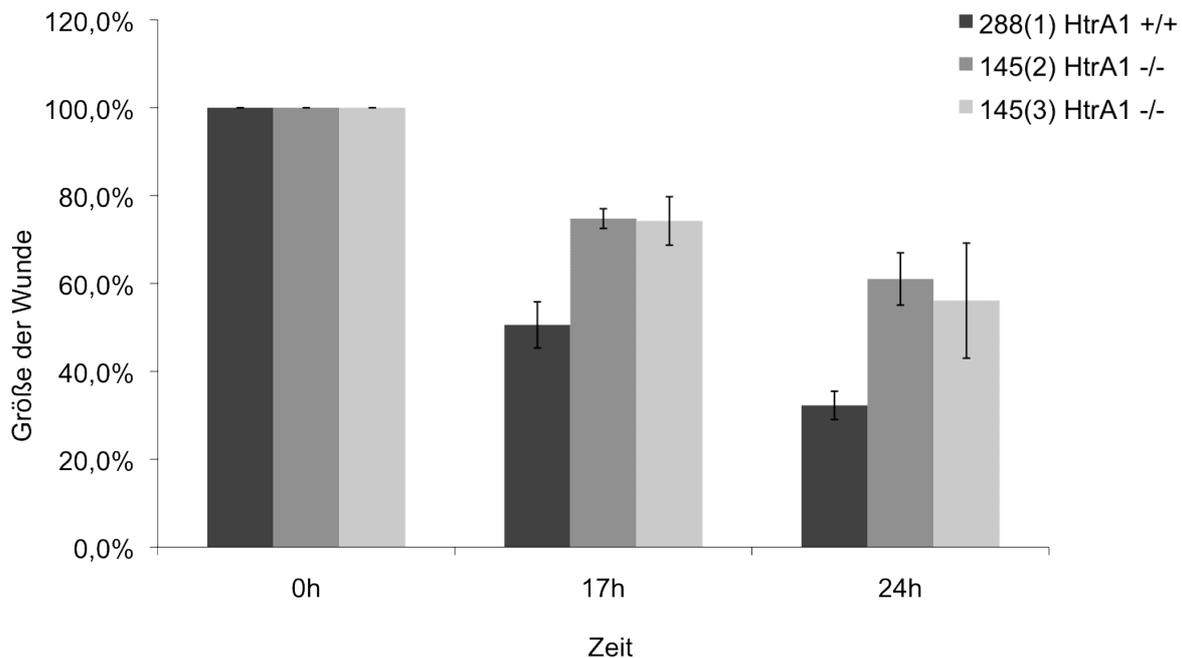


Abb. 4-15 Migrationsverhalten der Fibroblastenlinien 288(1) HtrA1+/+, 145(2) HtrA1-/- und 145(3) HtrA1-/-

Der 2D-Wundheilungs-Assay wurde in 6fach-Bestimmung unter Serumentzug durchgeführt. Die Bestimmung der Wundgröße erfolgte mit der *Software TScratch*. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der Wundgröße aus den 6fach-Bestimmungen in Prozent bezogen auf die Ursprungsgröße (0 h) sowie die Standardabweichungen.

Die Ergebnisse des 2D-Wundheilungs-Assays sind in Abb. 4-15 zu sehen. Die Bestimmung der Wundgröße erfolgte mit Hilfe des Programms *TScratch*. Die Auswertung der 6fach-Bestimmung ergab, dass die Zellen der Linien 145(2) HtrA1-/- und 145(3) HtrA1-/- langsamer in die zugefügte Wunde migrieren als die Zellen der Linie 288(1) HtrA1+/+. Nach 17 h haben die Zellen der HtrA1-Wildtyp-Linie bereits ca. 50% der Wunde verschlossen und nach 24 h ca. 70%. Die Zellen der beiden HtrA1-*knockout*-Linien haben dagegen nach 17 h nur ca. 25% und nach 24 h nur ca. 40 bis 45% der Wunde verschlossen. Die HtrA1-Wildtyp-Zellen migrieren im 2D-Wundheilungs-Assay also annähernd doppelt so schnell wie die HtrA1-*knockout*-Zellen.

4.3.6 Einfluss auf die Zellgröße

Da eine erhöhte Proliferationsrate und eine verlängerte Lebensdauer oft mit einer Verringerung der Zellgröße einher gehen, wurden Zelldurchmesser und Zellvolumen der Fibroblastenlinien 288(1) HtrA1+/+ und 145(2) HtrA1-/- mit Hilfe des Zellzählgerätes *Casy TT* bestimmt.

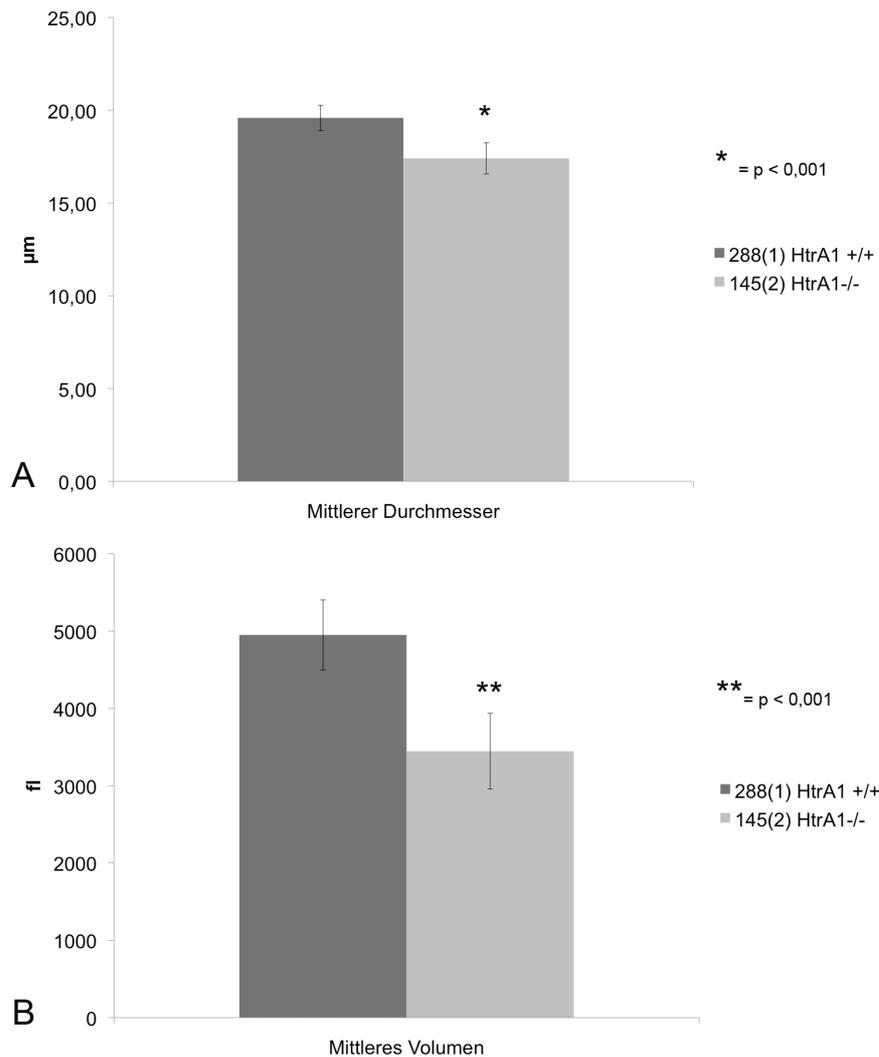


Abb. 4-16 Vergleich des mittleren Durchmessers und des mittleren Volumens der Fibroblastenlinien 288(1) HtrA1+/+ und 145(2) HtrA1-/-

Mittlerer Zelldurchmesser (A) und mittleres Zellvolumen (B) der beiden Fibroblastenlinien wurde an mehreren Tagen mit Hilfe des Zellzählgerätes Casy TT bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung.

Wie in Abb. 4-16 A zu sehen ist, ist der mittlere Zelldurchmesser der Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1-/- im Vergleich zur Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1+/+ um ca. 2 µm von 19 µm auf 17 µm verringert. Dieser Unterschied ist nach einem durchgeführten *Student's T-Test* mit einem p-Wert kleiner 0,001 statistisch signifikant. Das mittlere Volumen der Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1-/- ist im Vergleich zur Fibroblastenlinie 288(1) HtrA1+/+ um ca. 1500 fl verringert. Auch dieser Unterschied ist nach einem *Student's t-Test* mit einem p-Wert kleiner 0,001 statistisch signifikant.

4.4 Konsequenzen des knock downs von HtrA1 in der Kolonkarzinomzelllinie SW480

Die Konsequenzen des *knockdowns* von HtrA1 sollten ebenfalls in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 und den shHtrA1-Derivaten untersucht werden.

4.4.1 Einfluss auf den DNA-Gehalt

Wie in den primären embryonalen Mausfibroblasten (vgl. 4.3.1) wurden auch die HtrA1-*knockdown*-Derivate der Kolonkarzinomzelllinie SW480 hinsichtlich ihres DNA-Gehalts untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts ergab eine deutliche Verschiebung des Hauptpeaks von 2n (einfacher Chromosomensatz) nach 4n (doppelter Chromosomensatz) (Abb. 4-17) in der Zelllinie SW480 shHtrA1 D3. Die Zelllinie SW480 plkoLV zeigt diese Verschiebung nicht.

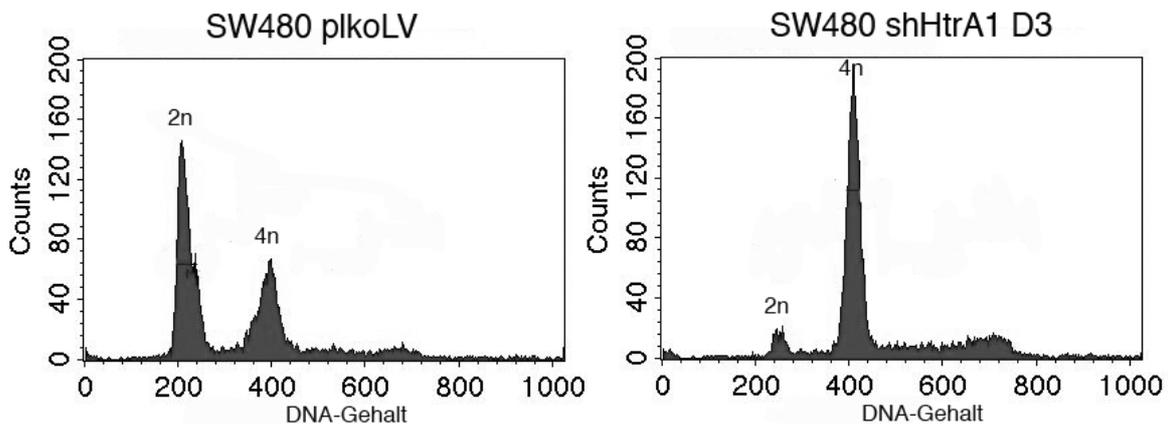


Abb. 4-17 Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts der beiden Zelllinien SW480 plkoLV und SW480 shHtrA1 D3

Der DNA-Gehalt der beiden Zelllinien SW480 plkoLV und SW480 shHtrA1 D3 wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Der Peak bei 200 entspricht dabei einem einfachen Chromosomensatz (2n), der Peak bei 400 entspricht einem doppelten Chromosomensatz (4n).

Zur weiteren Analyse des DNA-Gehalts wurde auch für die SW480-Zelllinien eine Karyotypisierung durchgeführt.

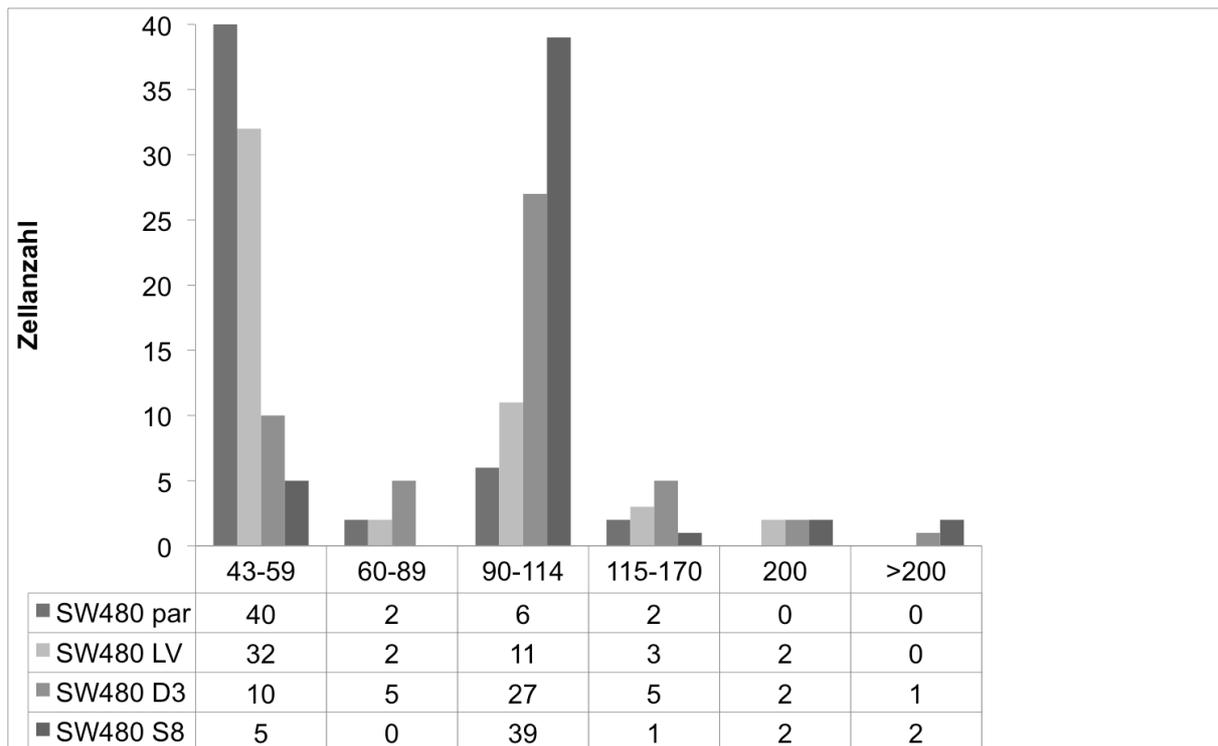


Abb. 4-18 Bestimmung der Chromosomenzahl der SW480-Zelllinien in 50 ausgewählten Mitosen

Die Zellen der vier SW480-Zelllinien wurden mit Colcemid behandelt und fixiert. Nach anschließender Aufarbeitung wurde dann die Anzahl der Chromosomen in jeweils 50 Mitosen bestimmt. 56 bis 58 Chromosomen entsprechen dabei einem normalen Chromosomensatz.

Der normale Chromosomensatz von SW480-Zellen beinhaltet 56 bis 58 Chromosomen (Melcher et al., 2000). Abb. 4-18 zeigt, dass die Chromosomenanzahl in den beiden Zelllinien SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 im Vergleich zu den beiden Zelllinien SW480 parental und SW480 plkoLV deutlich erhöht ist. Die meisten Zellen zeigen eine Chromosomenzahl von 90 bis 114, also in etwa einen doppelten Chromosomensatz.

4.4.2 Polyploidie in Abhängigkeit von der Zelldichte

Weitere Untersuchungen der SW480-Zelllinien zeigten, dass die Entstehung der Polyploidie in den Zelllinien SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 von der Zelldichte abhängt. Wurden die Zellen über mehrere Passagen bei unterschiedlicher Konfluenz gesplittet, so zeigten nur die shHtrA1-Zellen, die bei einer Konfluenz von ca. 90% gesplittet wurden, nach ca. 10 Passagen eine deutliche Verschiebung des DNA-Gehalts von 2n nach 4n (Abb. 4-19, rechte Spalte). Die shHtrA1-Zellen, die bei einer Konfluenz von ca. 60% gesplittet wurden zeigten diese Verschiebung dagegen nicht (Abb. 4-19, linke Spalte). Die Zelllinien SW480 parental und SW480 plkoLV zeigten unter beiden Bedingungen keine Veränderung des DNA-Gehalts.

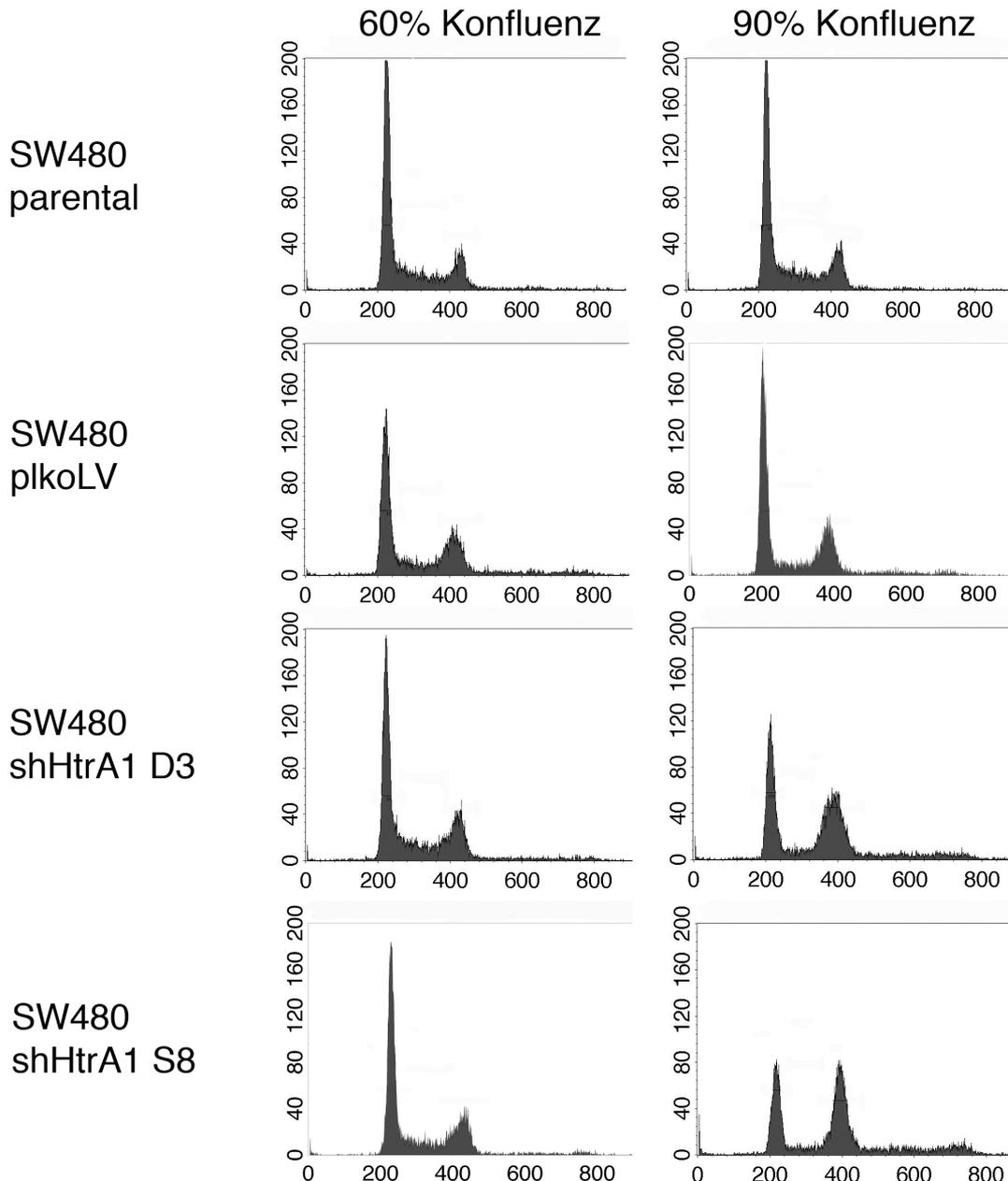


Abb. 4-19 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf den DNA-Gehalt

Die Zelllinien SW480 parental, SW480 plkoLV, SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 wurden entweder bei ca. 60% Konfluenz (linke Spalte) oder bei ca. 90% Konfluenz (rechte Spalte) passagiert. Nach 10 Passagen wurde der DNA-Gehalt der Zellen analysiert. Der Peak bei 200 entspricht einem einfachen Chromosomensatz (2n), der Peak bei 400 entspricht einem doppeltem Chromosomensatz (4n).

4.4.3 Einfluss auf die Expression von p21, p53 und Mdm2

Da HtrA1 einen Inhibitor des TGF β -Signalwegs darstellt (Oka et al., 2004), wurde die Expression von TGF β -Zielgenen in U373 shHtrA1-Zelllinien untersucht. Dabei fiel auf, dass die p21-RNA-Expression in den shRNA-Zelllinien deutlich reduziert ist (Daten nicht gezeigt, M. Campioni). Daraufhin wurde die p21-Expression auch in den SW480 shHtrA1-Zelllinien überprüft. Auch in diesen Zelllinien ist die p21-Expression

auf RNA-Ebene deutlich reduziert (Abb. 4-20). Die Proteinexpression von p21 konnte leider wegen eines fehlenden, funktionierenden Antikörpers nicht überprüft werden.

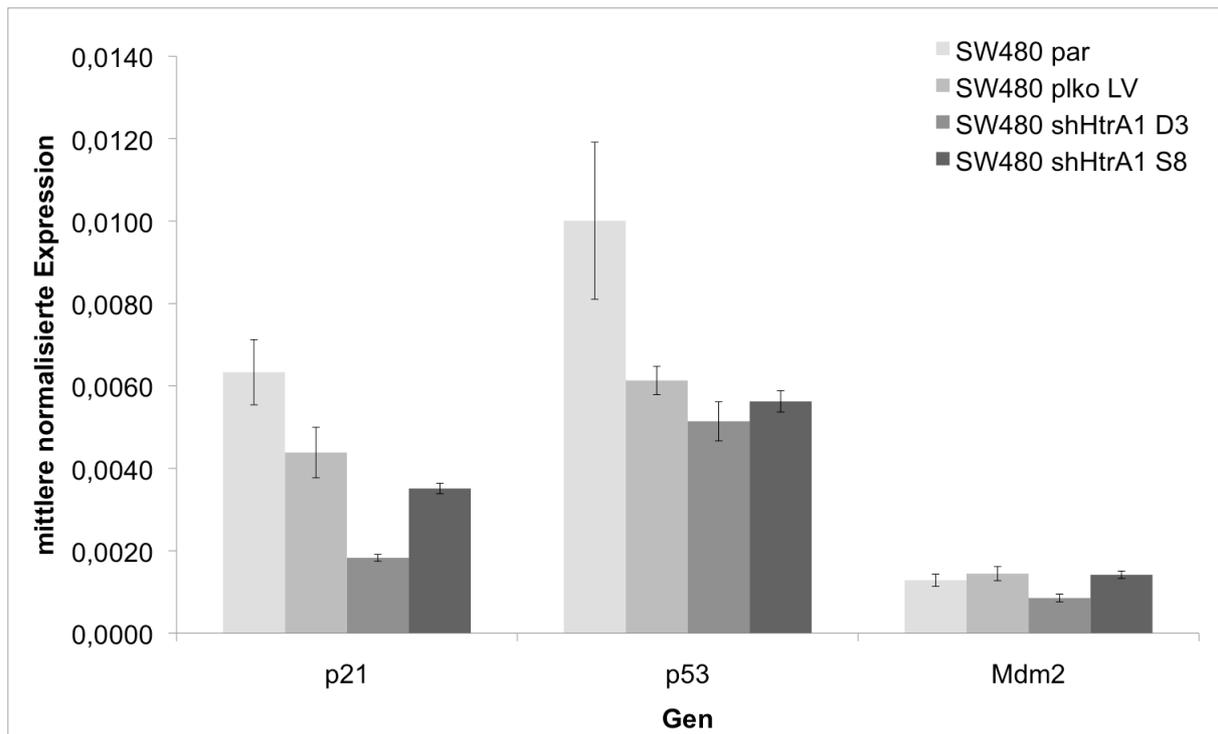


Abb. 4-20 p21-, p53- und Mdm2-RNA-Expression in SW480-Zelllinien

Die RNA-Expression von p21, p53 und Mdm2 in den Zelllinien SW480 parental, SW480 plkoLV, SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 wurde mittels qRT-PCR bestimmt.

p21 wird transkriptionell durch p53 reguliert (vgl. Abb. 1-3). Deshalb wurde die p53-Expression in den SW480-Zelllinien auf RNA- und Proteinebene überprüft. Die p53-Expression ist auf RNA-Ebene in den SW480 plkoLV-, SW480 shHtrA1 D3- und SW480 shHtrA1 S8-Zellen im Vergleich zu den parental SW480-Zellen um ca. 30% reduziert. Die drei Zelllinien SW480 plkoLV, SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 zeigen aber untereinander eine ähnliche p53-RNA-Expression (Abb. 4-20). Die p53-Proteinmenge ist dagegen in den Zelllinien SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 um ungefähr die Hälfte im Vergleich zur Zelllinie SW480 par reduziert (Abb. 4-21).

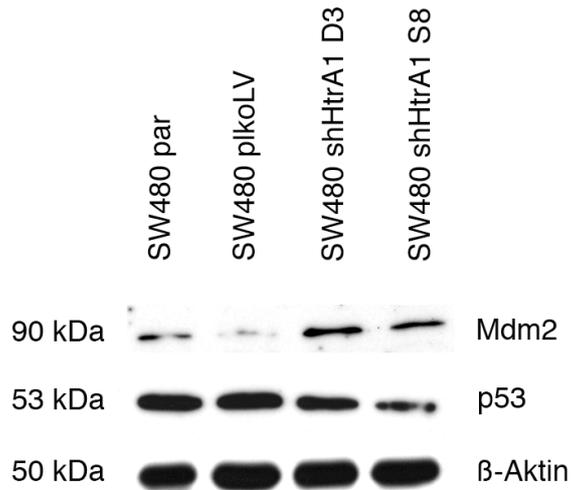


Abb. 4-21 p53- und Mdm2-Expression in SW480-Zelllinien

Die Proteinexpression von p53 und Mdm2 in den Zelllinien SW480 parental, SW480 plkoLV, SW480 ShHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 wurde mittels WesternBlot bestimmt. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin.

Da die p53-Proteinmenge vor allem durch Mdm2 reguliert wird (vgl. Abb. 1-3), wurde auch die RNA- und Proteinmenge von Mdm2 bestimmt. Die RNA-Expression von Mdm2 unterscheidet sich in den vier untersuchten Zelllinien kaum (Abb. 4-20). Die Proteinmenge dagegen ist in den beiden SW480 shHtrA1-Zelllinien im Vergleich zur parentalen SW480-Zelllinie und zur Leervektorkontrolle SW480 plkoLV deutlich erhöht (Abb. 4-21).

4.5 Die HtrA1-Expression verändert sich zellzyklusabhängig

Da die Höhe der HtrA1-Expression verschiedene Zellmerkmale bzw. -prozesse beeinflusst, die mit dem Zellzyklus zu tun haben, sollte untersucht werden, ob HtrA1 selber zellzyklusabhängig reguliert ist.

4.5.1 Primäre embryonale Mausfibroblasten

Für die zellzyklusabhängige Analyse der HtrA1-Expression musste die primäre embryonale Mausfibroblastenzelllinie 288(1) HtrA1 +/+ zunächst, wie unter 3.2.1.7.1 beschrieben, mit Aphidicolin synchronisiert werden. Danach wurden die Proben zu den angegebenen Zeitpunkten für die Analyse am Durchflusszytometer (vgl. 3.2.2.3) bzw. die Analyse der RNA-Expression präpariert (vgl. 3.2.3.2). Bei der Analyse am Durchflusszytometer wurde die mittlere Expression über die Zweitantikörperkontrolle normalisiert. Zur Überprüfung der Zellzyklusphasen wurde der DNA-Gehalt der Zellen überprüft (vgl. 3.2.2.1, Daten nicht gezeigt).

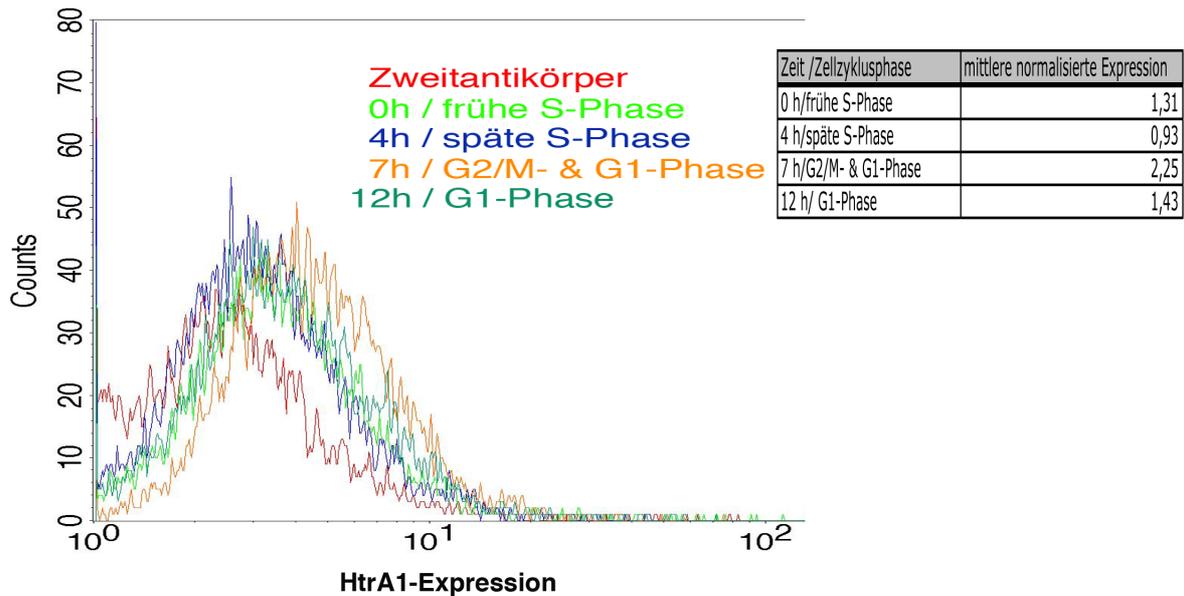


Abb. 4-22 Durchflusszytometrische Analyse der HtrA1-Protein-Expression in MEF in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Um die Proteinexpression von HtrA1 zu normalisieren, wurde das geometrische Mittel der Zweitantikörperkontrolle (rot) von den geometrischen Mitteln der HtrA1-Expression in der frühen S-Phase (hellgrün), in der späten S-Phase (blau), in der G₂/M- und frühen G₁-Phase (orange) und in der G₁-Phase (dunkelgrün) abgezogen. Die normalisierten mittleren Expressionswerte sind in der Tabelle oben rechts dargestellt.

Die durchflusszytometrische Analyse der HtrA1-Expression (Abb. 4-22) zeigt, dass die HtrA1-Expression in der G₂/M-Phase des Zellzyklus am Höchsten ist. Die Expression ist hier im Vergleich zu den anderen Phasen des Zellzyklus um den Faktor 1,6 bis 2,4 erhöht.

Abb. 4-23 zeigt, dass die RNA-Expression von HtrA1 sich in den verschiedenen Zellzyklusphasen kaum unterscheidet. Der höchste Wert findet sich am Ende der S-Phase, der niedrigste in der G₂/M-Phase.

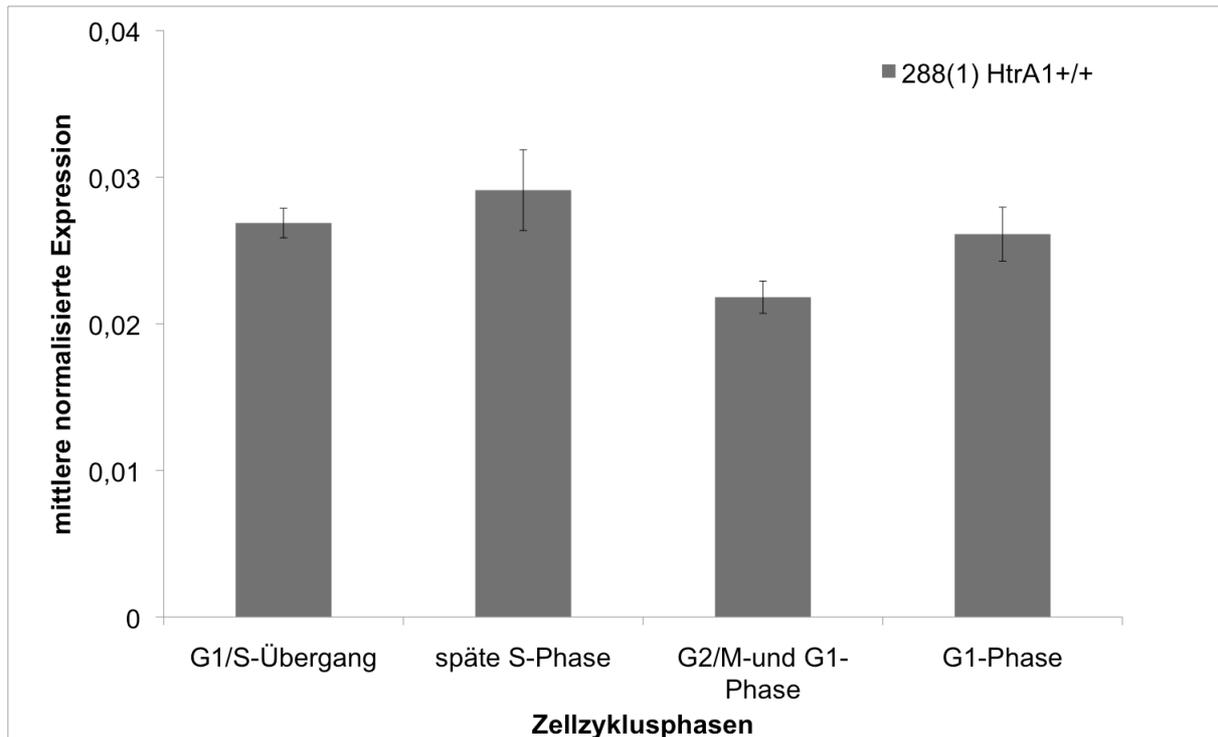


Abb. 4-23 RNA-Expression von HtrA1 in MEF in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Die Mausfibroblastenzellen wurden zunächst mit Aphidicolin synchronisiert und dann zu den entsprechenden Zeitpunkten für die RNA-Analyse präpariert. Die mittlere normalisierte Expression von HtrA1 wurde dann mittels qRT-PCR bestimmt. Die Zellzyklusphasen wurden parallel in weiteren Proben mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

4.5.2 Kolonkarzinomzelllinie SW480

Die Zelllinie SW480 parental wurde zunächst, wie unter 3.2.1.7.2 beschrieben, mit einem Doppel-Thymidin-Block synchronisiert und dann zu den angegebenen Zeitpunkten für die Analyse am Durchflusszytometer (vgl. 3.2.2.3) bzw. die Analyse der RNA (vgl. 3.2.3.2) präpariert. Bei der Analyse am Durchflusszytometer wurde die mittlere Expression über die Zweitantikörperkontrolle normalisiert. Zur Überprüfung der Zellzyklusphasen wurde der DNA-Gehalt der Zellen überprüft (vgl. 3.2.2.1, Daten nicht gezeigt).

Abb. 4-24 zeigt, dass sich die Menge an HtrA1 in den Zellen zwischen G₁-Phase und G₂/M-Phase deutlich ändert. In der G₁-Phase ist HtrA1 nicht nachweisbar. Dies ändert sich während der S-Phase und während der G₂/M-Phase ist die HtrA1-Expression mehr als doppelt so groß wie zu Beginn der S-Phase.

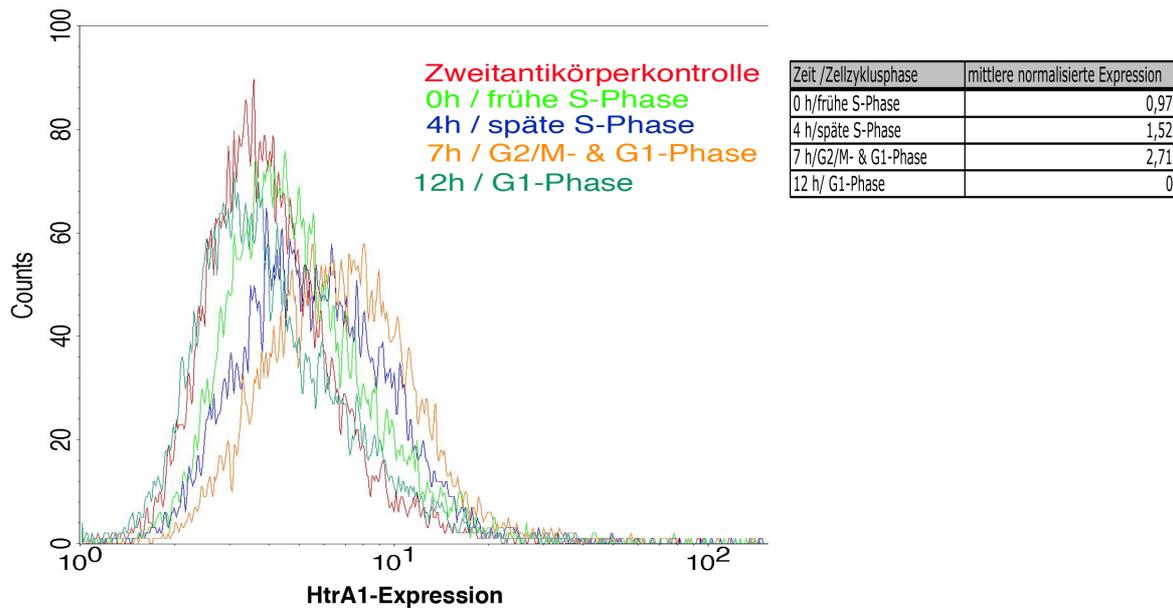


Abb. 4-24 Durchflusszytometrische Analyse der HtrA1-Protein-Expression in SW480 parental in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Um die Proteinexpression von HtrA1 zu normalisieren, wurde das geometrische Mittel der Zweitantikörperkontrolle (rot) von den geometrischen Mitteln der HtrA1-Expression in der frühen S-Phase (hellgrün), in der späten S-Phase (blau), in der G₂/M- und frühen G₁-Phase (orange) und in der G₁-Phase (dunkelgrün) abgezogen. Die normalisierten mittleren Expressionswerte sind in der Tabelle oben rechts dargestellt.

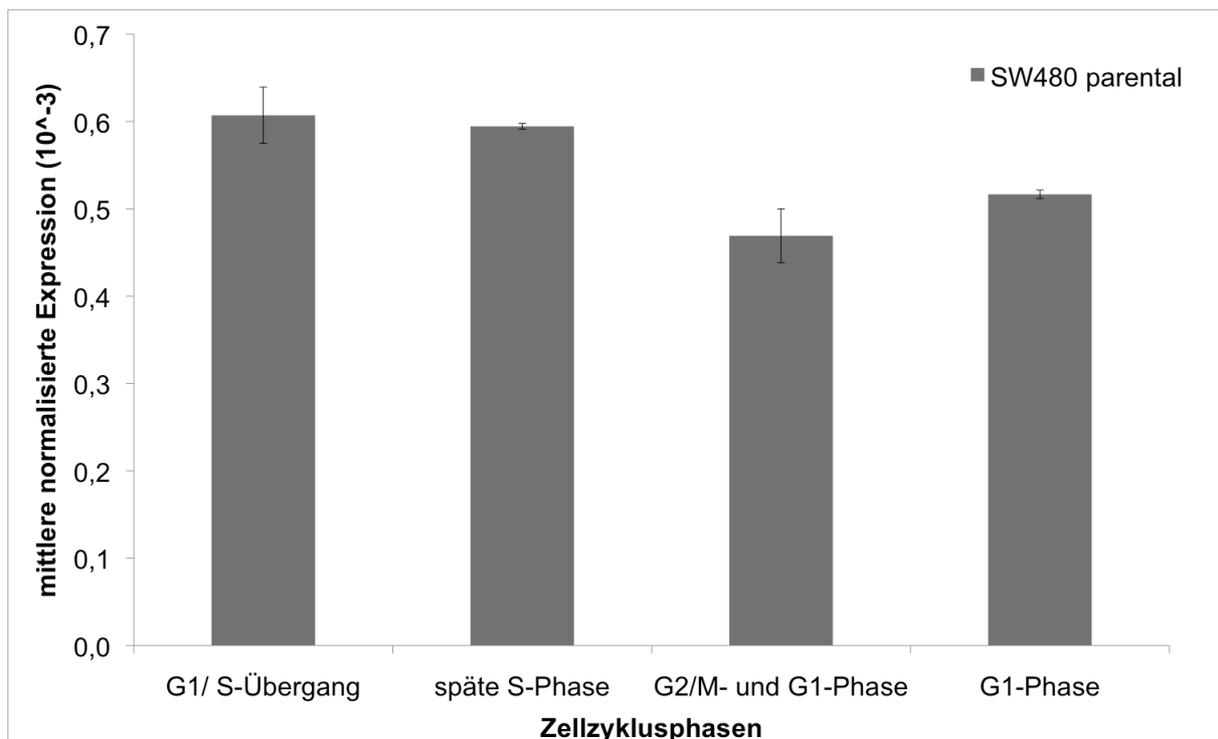


Abb. 4-25 RNA-Expression von HtrA1 in SW480 parental in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Die Kolonkarzinomzelllinie SW480 parental (SW480 par) wurde zunächst mittels Doppel-Thymidin-Block synchronisiert und dann zu den entsprechenden Zeitpunkten für die RNA-Analyse präpariert. Die mittlere normalisierte Expression von HtrA1 wurde dann mittels qRT-PCR bestimmt. Die Zellzyklusphasen wurden parallel in weiteren Proben mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die HtrA1-Expression auf RNA-Ebene unterscheidet sich in den SW480 parental kaum in Abhängigkeit vom Zellzyklus (Abb. 4-25). Der höchste Wert findet sich hier in der S-Phase während der Wert in der G₂/M-Phase am niedrigsten ist.

4.6 Mögliche Regulationswege von HtrA1

Viele Proteine der HtrA-Familie werden mit der Protein-Qualitätskontrolle und der zellulären Stressantwort in Verbindung gebracht (Clausen et al., 2002). Dies gilt vor allem für die bakteriellen HtrAs und das humane HtrA2. Auch das humane HtrA1 wurde bereits mit der zellulären Antwort auf oxidativen Stress in Verbindung gebracht (Zurawa-Janicka et al., 2008). Es gibt bis jetzt, außer einer epigenetischen Regulation in Krebszellen, kaum Hinweise auf den Regulationsmechanismus von HtrA1. Deshalb sollte durch Behandlung von Zelllinien mit verschiedenen Chemikalien zellulärer Stress verursacht werden und dadurch eine differentielle Regulation von HtrA1 erreicht werden. Diese sollte dann mit Hilfe eines cDNA-Microarrays analysiert werden.

4.6.1 Suche nach Bedingungen unter denen HtrA1 unterschiedlich reguliert ist

Zunächst wurden verschiedene Antibiotika, Chemotherapeutika und Chemikalien ausgewählt, die nachweislich zellulären Stress verursachen. Diese Substanzen wurden dann in verschiedenen Konzentrationen und für verschiedene Zeiträume zu Zellen der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW480 und der humanen Astrozytomzelllinie U373 gegeben. Anschließend wurde die HtrA1-RNA-Expression bestimmt. Reproduzierbare Ergebnisse in beiden Zelllinien zeigten die beiden Substanzen Brefeldin A und Actinomycin D. Bei Brefeldin A handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum*. Es zerstört die Struktur und Funktion des Golgi-Apparates (Burgess et al., 1991) und aktiviert den Sphingomyelin-Zyklus. Actinomycin D ist ein antineoplastisches Antibiotikum. Es inhibiert die Zellproliferation durch Bildung eines stabilen Komplexes mit der DNA. Dadurch wird die DNA-abhängige RNA-Synthese gestört, da die Bewegung der RNA-Polymerase blockiert wird (Wu et al., 2005).

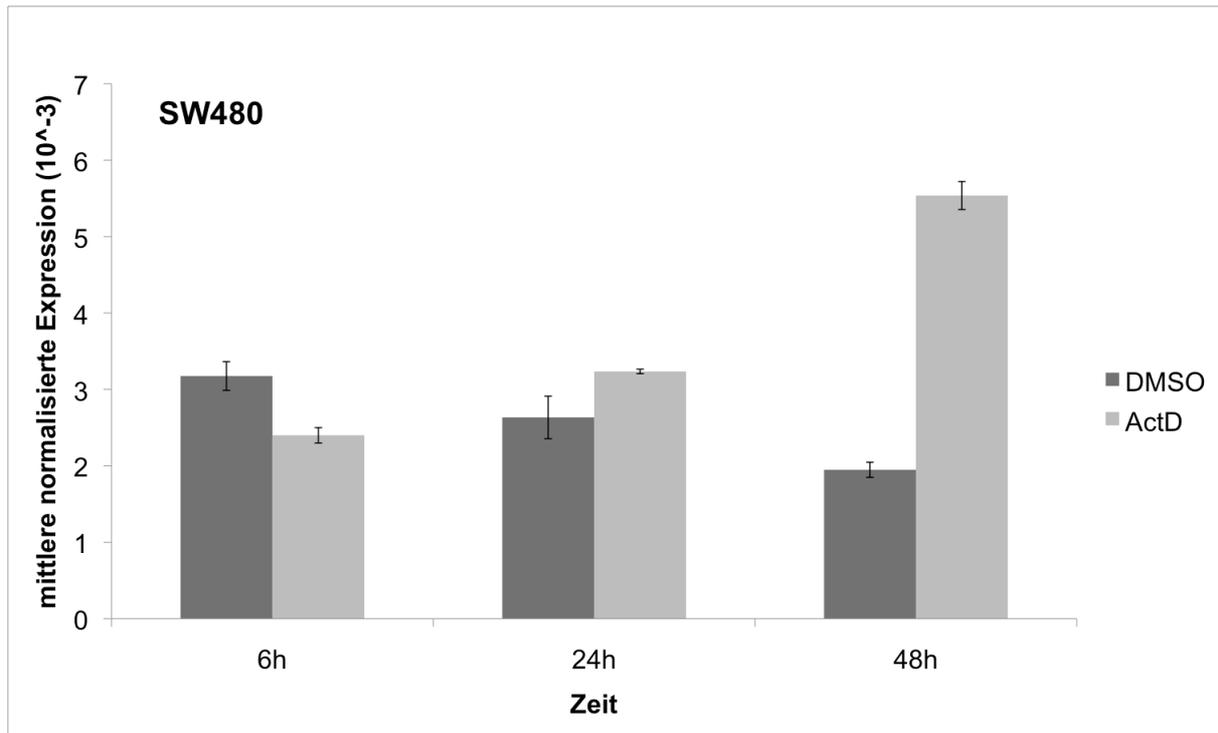


Abb. 4-26 Auswirkungen der Actinomycin D-Behandlung auf die HtrA1-Expression in SW480-Zellen

Die SW480-Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit Actinomycin D (ActD) gelöst in DMSO oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die HtrA1-Expression wurde anschließend mittels qRT-PCR bestimmt.

Abb. 4-26 zeigt die HtrA1-Expression in SW480-Zellen nach Actinomycin D-Behandlung. Nach 6 h ist die HtrA1-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO um ca. ein Viertel reduziert. Nach 24 h steigt die HtrA1-Expression leicht an. Nach 48 h ist die HtrA1-Expression mehr als doppelt so groß wie in der Lösungsmittelkontrolle.

In Abb. 4-27 ist die Auswirkung der Actinomycin D-Behandlung auf die HtrA1-Expression in U373-Zellen zu sehen. Nach 6 h Behandlungsdauer ist die HtrA1-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nahezu unverändert. Nach 24 h hat sich die HtrA1-Expression in den mit Actinomycin D behandelten Zellen fast verdoppelt. Nach 48 h Actinomycin D-Behandlung ist die HtrA1-Expression auf das Vierfache des Wertes der Lösungsmittelkontrolle angestiegen.

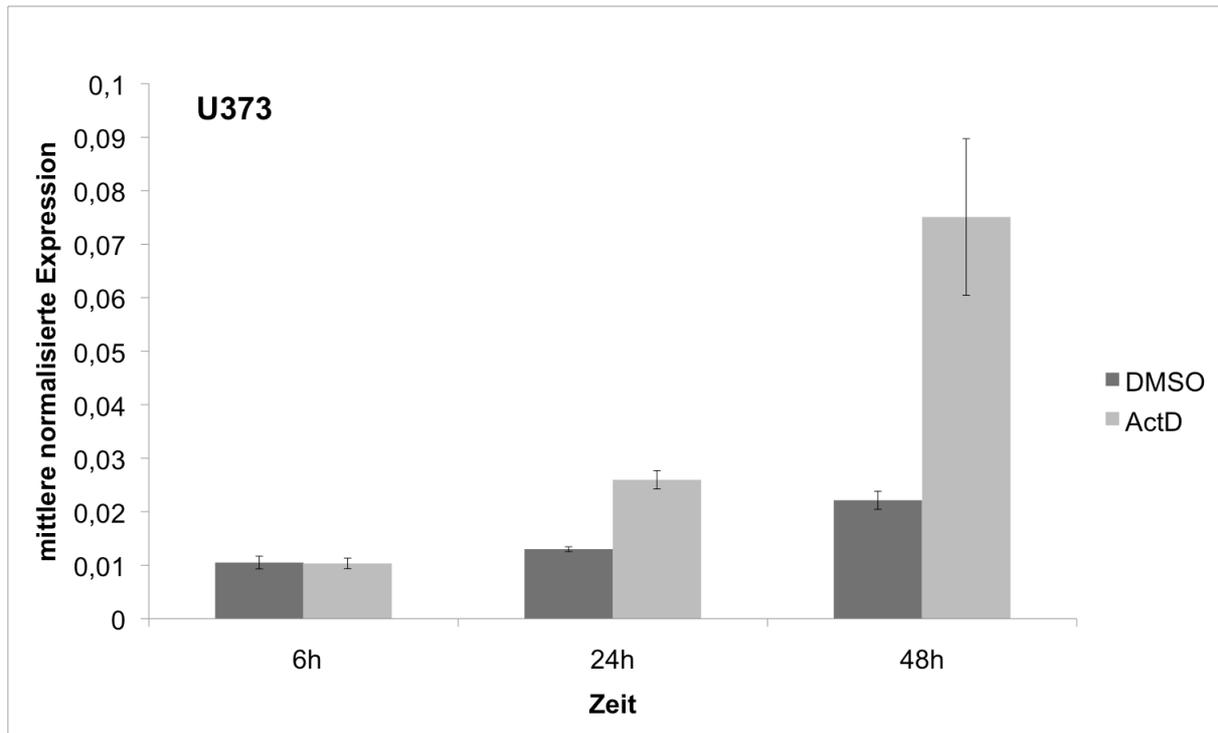


Abb. 4-27 Auswirkungen der Actinomycin D-Behandlung auf die HtrA1-Expression in U373-Zellen

Die U373-Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit Actinomycin D (ActD) gelöst in DMSO oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die HtrA1-Expression wurde dann mittels qRT-PCR bestimmt.

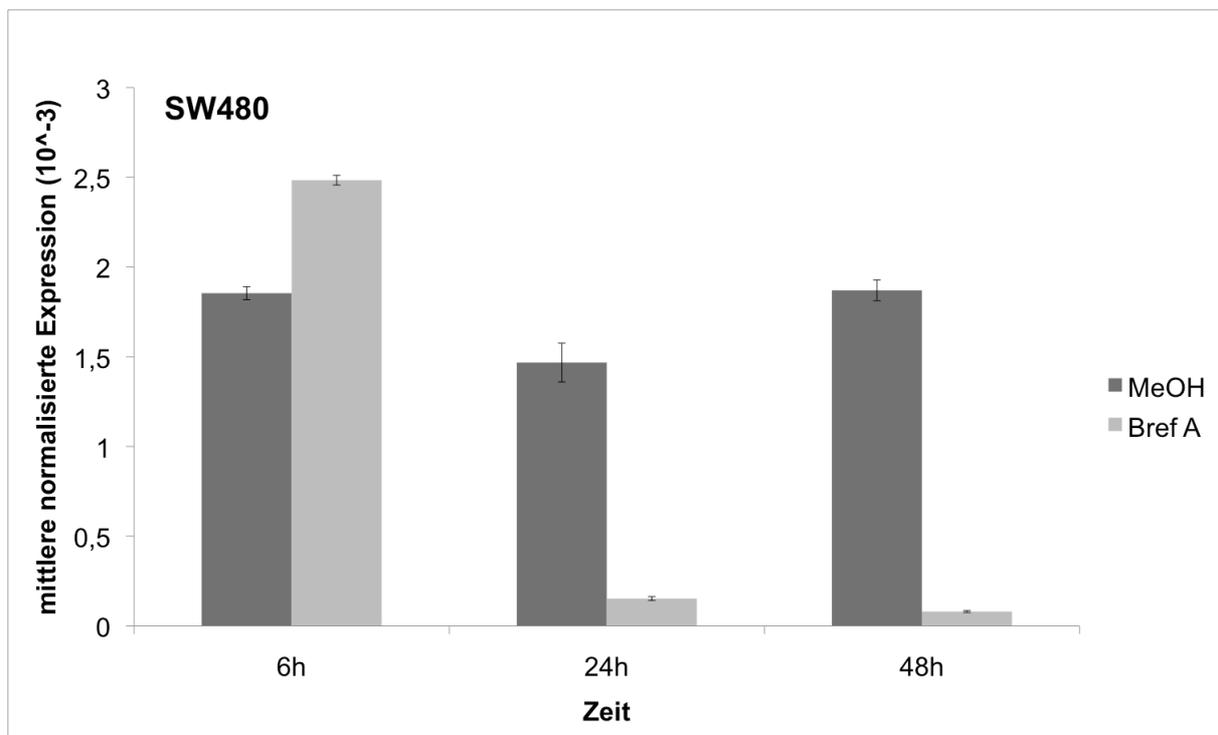


Abb. 4-28 Auswirkungen der Brefeldin A-Behandlung auf die HtrA1-Expression in SW480-Zellen

Die SW480-Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit Brefeldin A (BrefA) gelöst in Methanol oder dem Lösungsmittel Methanol (MeOH) behandelt. Die HtrA1-Expression wurde anschließend mittels qRT-PCR bestimmt.

Die HtrA1-Expression in SW480-Zellen nach Behandlung mit Brefeldin A ist in Abb. 4-28 zu sehen. Nach sechsständiger Behandlung ist die HtrA1-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um ca. ein Drittel erhöht. Nach 24 h Brefeldin A-Behandlung ist die HtrA1-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um ca. 85% reduziert, nach 48 h sogar um ca. 95%.

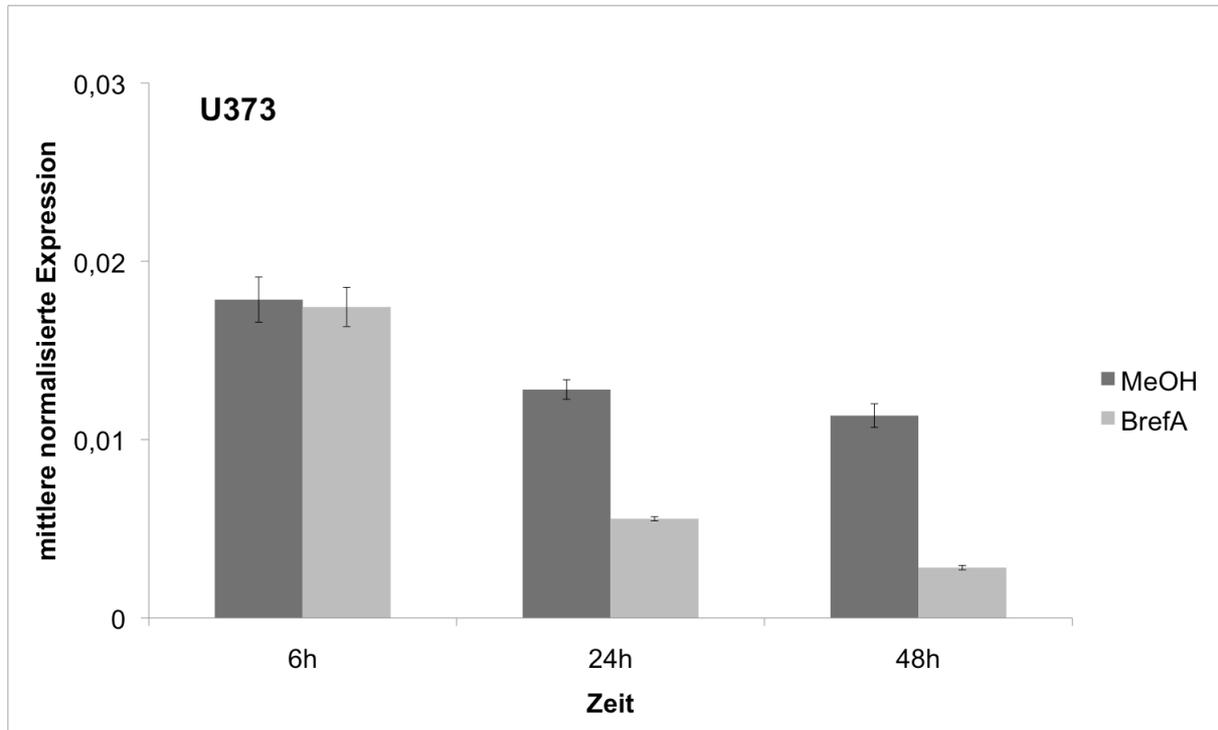


Abb. 4-29 Auswirkungen der Brefeldin A-Behandlung auf die HtrA1-Expression in U373-Zellen
Die U373-Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit Brefeldin A (BrefA) gelöst in Methanol oder dem Lösungsmittel Methanol (MeOH) behandelt. Die HtrA1-Expression wurde dann mittels qRT-PCR bestimmt.

Abb. 4-29 zeigt den Einfluss der Brefeldin A-Behandlung auf die HtrA1-Expression in U373-Zellen. Diese ist nach 6 h in den mit Brefeldin A behandelten und den mit Lösungsmittel behandelten Zellen fast gleich. Nach 24 h nimmt die HtrA1-Expression in den mit Brefeldin A behandelten Zellen um mehr als die Hälfte ab. Nach 48 h zeigen die Zellen, die mit Brefeldin A behandelt wurden, verglichen mit den Zellen, die mit Lösungsmittel behandelt wurden, eine um ca. 75% reduzierte HtrA1-Expression.

4.6.2 cDNA-Microarray

Zur weiteren Untersuchung der differentiellen Regulation der HtrA1-Expression wurde ein *Whole Genome Array* von Affymetrix durchgeführt. Die Durchführung erfolgte durch PD Dr. Klein-Hitpass, Universitätsklinikum Essen. Mit Hilfe des Arrays sollten nachfolgend Gene identifiziert werden, die, unter den oben getesteten Bedingungen, ein ähnliches Expressionsmuster in SW480-Zellen zeigen wie HtrA1. Anhand der

eventuell schon bekannten Regulationswege dieser Gene kann dann auf mögliche Regulationswege von HtrA1 geschlossen werden.

Die Auswertung des Arrays ergab eine Gruppe von 568 Genen, die wie HtrA1 bei Actinomycin D-Behandlung hochreguliert und bei Brefeldin A-Behandlung herunterreguliert werden. Es ergab sich außerdem eine Gruppe von 545 Genen, die bei Actinomycin D-Behandlung herunterreguliert und bei Brefeldin A-Behandlung hochreguliert werden. Der Schwerpunkt bei der weiteren Auswertung wurde jedoch auf die erste Gruppe gelegt. Die Gene dieser ersten Gruppe wurden nun anhand ihrer bekannten Funktionen sortiert. Besonders interessant waren dabei Gene, die bekannterweise eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation (Tabelle 4-1) oder beim Aufbau des Zytoskeletts (Tabelle 4-2) spielen.

Tabelle 4-1 Gene, die eine Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und Proliferation spielen und ähnlich wie HtrA1 reguliert sind

Gensymbol	Genname	signal log ratio Act D	signal log ratio Bref A
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	1,803	-1,218
C6orf26 /// MSH5	mutS homolog 5 (E. coli) /// chromosome 6 open reading frame 26	2,118	-1,553
CADM1	cell adhesion molecule 1	1,575	-2,228
CADM4	cell adhesion molecule 4	2,110	-2,465
CAPN1	calpain 1, (mu/l) large subunit	1,423	-1,613
CAV2	caveolin 2	1,878	-1,923
CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	1,097	-1,590
CCND1	cyclin D1	2,065	-2,423
CD81	CD81 molecule	1,493	-1,160
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	1,270	-2,120
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	2,275	-1,110
CKLF	chemokine-like factor	1,250	-2,238
CLEC11A	C-type lectin domain family 11, member A	1,493	-1,368
CLU	clusterin	2,165	-2,810
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	1,760	-1,450
CRIP1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)	1,813	-2,188
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	2,150	-1,070
FAM33A	family with sequence similarity 33, member A	1,605	-1,500
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I	1,568	-2,408
GAL	galanin prepropeptide	1,430	-1,358
GLI3	GLI-Kruppel family member GLI3 (Greig cephalopolysyndactyly syndrome)	2,540	-3,208
GPC4	glypican 4	2,058	-1,428
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	1,397	-1,248
HELLS	helicase, lymphoid-specific	1,528	-3,860
HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	1,718	-3,743
HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	1,470	-1,263
IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	2,850	-2,488
KNTC1	kinetochore associated 1	1,183	-1,360

LAMB1	laminin, beta 1	1,243	-2,425
LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	1,215	-1,037
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	2,535	-1,393
MIA	melanoma inhibitory activity	2,158	-2,518
MSH5	mutS homolog 5 (E. coli)	2,065	-3,508
NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	1,163	-1,088
PAM	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	1,330	-2,215
PBK	PDZ binding kinase	1,825	-2,030
PCAF	p300/CBP-associated factor	1,608	-1,685
RPA1	replication protein A1, 70kDa	1,868	-1,528
SEPT11	septin 11	2,125	-1,725
SEPT8	septin 8	1,325	-1,530
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	1,538	-1,098
TCFL5	transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)	1,598	-1,218
TFDP1	transcription factor Dp-1	1,780	-1,107
TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	1,267	-2,375
TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	1,810	-3,285
TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)	1,448	-3,018
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	1,830	-1,290
TSPAN1	tetraspanin 1	1,203	-1,208
VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1	1,303	-1,253
WWOX	WW domain containing oxidoreductase	1,655	-1,493
ZAK	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	1,438	-2,020
ZWINT	ZW10 interactor	1,678	-2,588

Tabelle 4-2 Gene, die eine Rolle beim Aufbau des Zytoskeletts spielen und ähnlich wie Htra1 reguliert sind

Gensymbol	Genname	signal log ratio Act D	signal log ratio Bref A
ABLIM1	actin binding LIM protein 1	1,265	-1,783
ARPC1B /// LOC653888	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa /// similar to Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B (ARP2/3 complex 41 kDa subunit) (p41-ARC)	1,595	-1,037
CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	2,685	-2,070
CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	1,097	-1,590
EPB41L2	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	2,580	-1,118
FARP1	FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	1,253	-1,203
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	1,348	-1,540
LIMA1	LIM domain and actin binding 1	2,300	-1,615
MGC39900 /// TMSL8	thymosin-like 8 /// hypothetical protein MGC39900	1,903	-2,673
MYH10	myosin, heavy chain 10, non-muscle	1,028	-1,698
MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle	1,268	-1,255
MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	1,963	-3,218
PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	1,415	-1,250
PLS1	plastin 1 (I isoform)	1,815	-2,533
SEPT11	septin 11	2,125	-1,725

TNNC1	troponin C type 1 (slow)	3,355	-1,325
VIL1	villin 1	1,370	-1,753
WASF3	WAS protein family, member 3	1,845	-1,885

Außerdem wurden auch viele Gene, die für Bestandteile der extrazellulären Matrix codieren, identifiziert. Dazu gehören Collagene, Laminine, Integrine und IGFBPs. Zusätzlich wurden die Ergebnisse dieses Arrays auch noch mit den Ergebnissen eines weiteren Arrays verglichen, bei dem Rattenzellen mit der pseudohyperphosphorylierten Form des tau-Proteins behandelt wurden, um die HtrA1-Expression zu beeinflussen (A.Tennstädt, AG Ehrmann). Dabei wurden 27 Gene identifiziert, deren Expression unter den drei verwendeten Bedingungen mit HtrA1 gleich reguliert ist (vgl. Tabelle 4-3). Außerdem wurden 30 Gene identifiziert, deren Expression unter den drei verwendeten Bedingungen gegensätzlich zu HtrA1 reguliert ist (vgl. Tabelle 4-4).

Tabelle 4-3 Gene, die unter den verwendeten Bedingungen ähnlich wie HtrA1 reguliert sind

Gensymbol	Gename
GNB1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
S100A10	S100 calcium binding protein A10
CD59	CD59 molecule, complement regulatory protein
HTRA1	HtrA serine peptidase 1
PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase
DKK3	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
S100A4	S100 calcium binding protein A4
CROT	carnitine O-octanoyltransferase
L1CAM	L1 cell adhesion molecule
CCND1	cyclin D1
CADM1	cell adhesion molecule 1
CTSL2	cathepsin L2
LMNA	lamin A/C
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
Sep10	septin 10
PAM	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)
GSTK1	glutathione S-transferase kappa 1
TMEM38B	transmembrane protein 38B
EPDR1	ependymin related protein 1 (zebrafish)
C10orf58	chromosome 10 open reading frame 58
ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18
FMNL2	formin-like 2
PCGF5	polycomb group ring finger 5
HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
NPW	neuropeptide W

Tabelle 4-4 Gene, die unter den verwendeten Bedingungen gegensätzlich zu HtrA1 reguliert sind

Gensymbol	Genname
BLCAP	bladder cancer associated protein
TXNRD1	thioredoxin reductase 1
JUN	jun oncogene
JUNB	jun B proto-oncogene
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
IER2	immediate early response 2
DRG1	developmentally regulated GTP binding protein 1
PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
STC2	stanniocalcin 2
ASNS	asparagine synthetase
SRP19	signal recognition particle 19kDa
GARS	glycyl-tRNA synthetase
AK2	adenylate kinase 2
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
NRP1	neuropilin 1
SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3
MAP2K1IP1	mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1
TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)
NAGK	N-acetylglucosamine kinase
TMEM22	transmembrane protein 22
CRNKL1	crooked neck pre-mRNA splicing factor-like 1 (Drosophila)
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)
TBC1D23	TBC1 domain family, member 23
C11orf46	Chromosome 11 open reading frame 46
FAM58A	family with sequence similarity 58, member A
ZNF503	zinc finger protein 503
MAFF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)

4.6.3 Validierung von Treffern

Aus den unter 4.6.2 identifizierten Gene wurden einige ausgewählt, um ihr Expressionsmuster unter den verwendeten Bedingungen (vgl. 4.6.1) mit Hilfe von qRT-PCR zu bestätigen. Dazu gehörten Cyclin D₁, IGFBP2, CDK2, Fos und Jun. Die Expression dieser Gene nach Behandlung mit Actinomycin D oder Brefeldin A wurde sowohl in SW480-Zellen als auch in U373-Zellen getestet, um sicher zu stellen, dass es sich nicht um einen Zelllinien-spezifischen Effekt handelt. Das Expressionsmuster von Jun ließ sich weder in SW480-Zellen noch in U373-Zellen bestätigen (Daten nicht gezeigt). Das Expressionsmuster von Fos und CDK2 ließ sich lediglich in den behandelten SW480-Zellen bestätigen, nicht aber in den behandelten U373-Zellen (Daten nicht gezeigt).

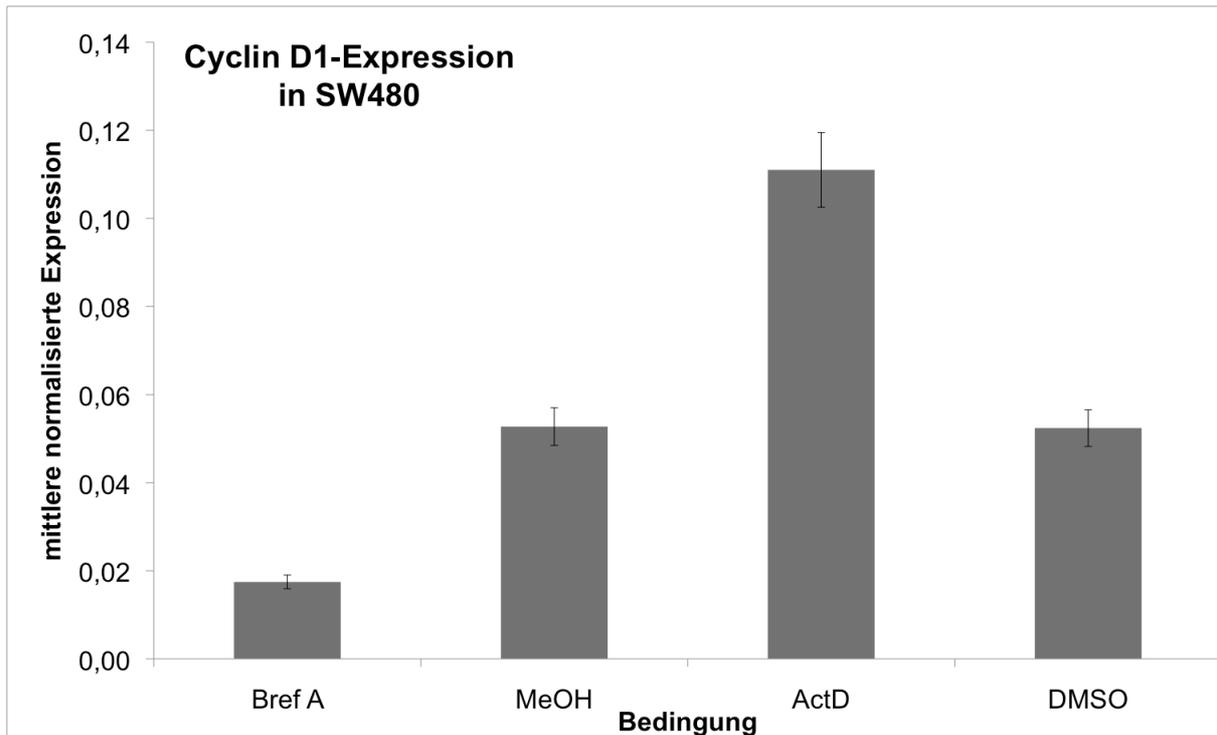


Abb. 4-30 Cyclin D₁-Expression nach Behandlung mit Brefeldin A oder Actinomycin D in SW480-Zellen

Die Zellen wurden für 24 h mit Brefeldin A bzw. Methanol oder für 48 h mit Actinomycin D bzw. DMSO behandelt. Anschließend wurde die Cyclin D₁-Expression mittels qRT-PCR bestimmt.

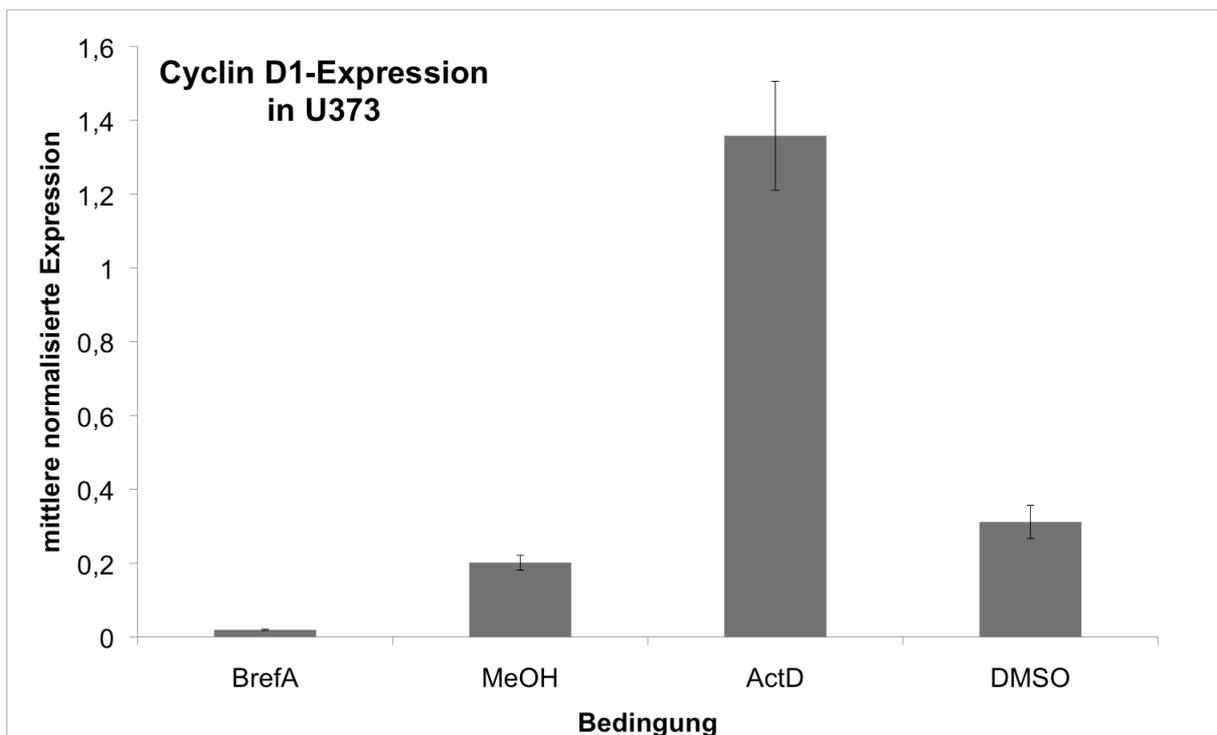


Abb. 4-31 Cyclin D₁-Expression nach Brefeldin A- oder Actinomycin D-Behandlung in U373-Zellen

Die Zellen wurden für 24 h mit Brefeldin A bzw. Methanol oder für 48 h mit Actinomycin D bzw. DMSO behandelt. Anschließend wurde die Cyclin D₁-Expression mittels qRT-PCR bestimmt.

Abb. 4-30 zeigt das Expressionsmuster von Cyclin D₁ in, mit Brefeldin A oder Actinomycin D behandelten, SW480-Zellen. Abb. 4-31 zeigt die Cyclin D₁-Expression in entsprechend behandelten U373-Zellen. In beiden Abbildungen ist deutlich zu sehen, dass Cyclin D₁ nach Behandlung mit Brefeldin A oder Actinomycin D eine ähnliche Expression zeigt wie HtrA1 (vgl. Abb. 4-26 bis Abb. 4-27). Demnach verursacht eine Behandlung der Zellen mit Brefeldin A eine Herunterregulation von Cyclin D₁ während eine Behandlung mit Actinomycin D eine Hochregulation von Cyclin D₁ verursacht.

Auch die Expression von IGFBP2 wurde in SW480- und U373-Zellen, die mit Brefeldin A oder Actinomycin D behandelt wurden, analysiert. Dabei zeigen sowohl SW480-Zellen (Abb. 4-32) als auch U373-Zellen (Abb. 4-33) eine IGFBP2-Expression, die durch die Behandlung der Zellen ähnlich reguliert ist wie die HtrA1-Expression.

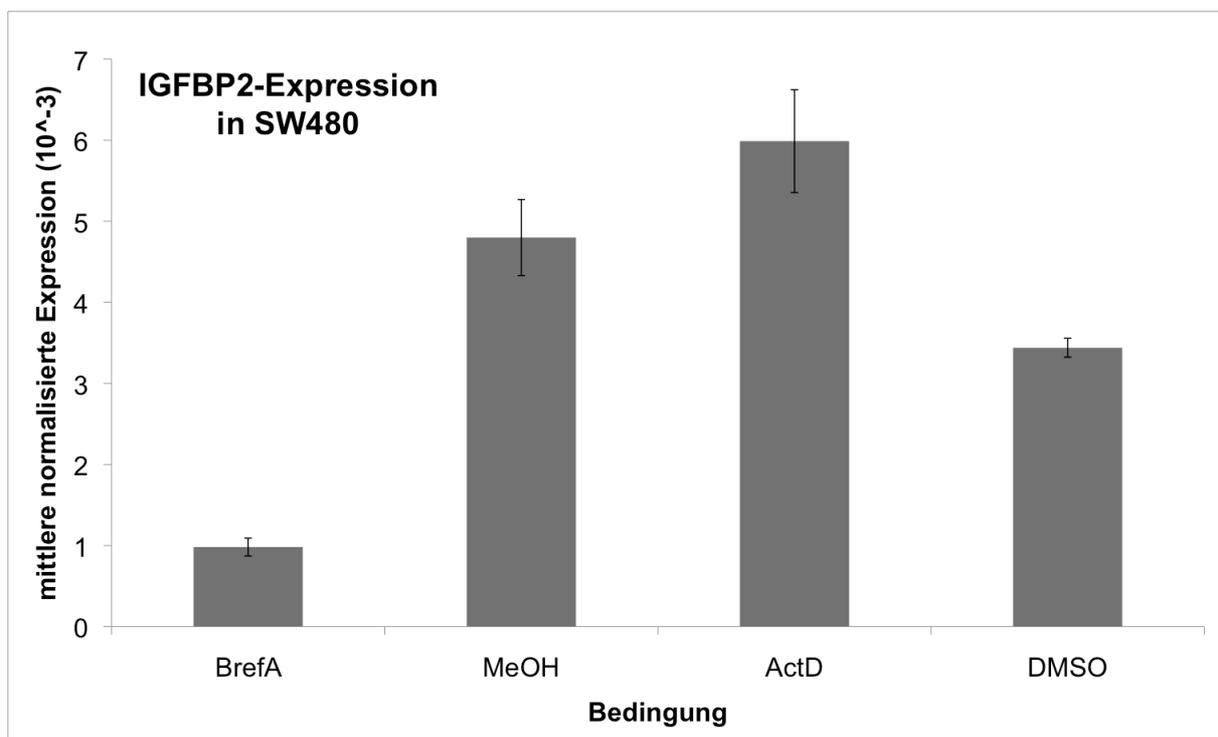


Abb. 4-32 IGFBP2-Expression nach Brefeldin A- oder Actinomycin D-Behandlung in SW480

Die Zellen wurden für 24 h mit Brefeldin A bzw. Methanol oder für 48 h mit Actinomycin D oder DMSO behandelt. Anschließend wurde die Cyclin D₁-Expression mittel qRT-PCR bestimmt.

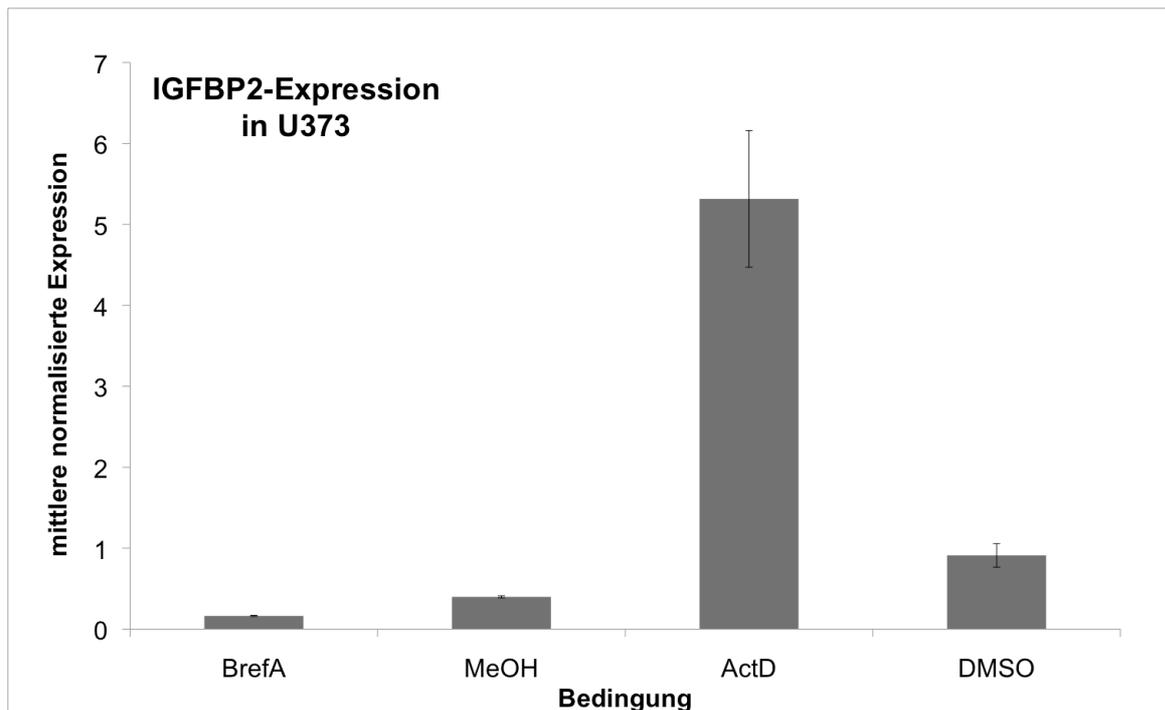


Abb. 4-33 IGFBP2-Expression nach Brefeldin A- oder Actinomycin D-Behandlung in U373

Die Zellen wurden für 24 h mit Brefeldin A bzw. Methanol oder für 48 h mit Actinomycin D oder DMSO behandelt. Anschließend wurde die Cyclin D₁-Expression mittel qRT-PCR bestimmt.

Durch die Brefeldin A-Behandlung wird die IGFBP2-Expression herunterreguliert und durch die Actinomycin D-Behandlung wird die IGFBP2-Expression hochreguliert.

Tabelle 4-5 Vergleich der log₂ ratios für IGFBP2 und Cyclin D₁ (CCND1) in Array und qRT-PCR

Gensymbol	ActD vs. DMSO Array	BrefA vs. MeOH Array
IGFBP2	1,40	-2,78
CCND1	2,06	-2,42
	ActD vs. DMSO qRT-PCR	BrefA vs. MeOH qRT-PCR
IGFBP2	1,16	-2,54
CCND1	1,20	-1,51

Tabelle 4-5 zeigt einen Vergleich der log₂ ratios aus Array und qRT-PCR für die IGFBP2- und Cyclin D₁-Expression in SW480. Ein Wert von Eins bedeutet dabei eine Verdopplung der Expression, ein Wert von minus Eins eine Halbierung. Die Werte für IGFBP2 sind in Array und qRT-PCR sehr ähnlich. Die Werte für Cyclin D₁ weichen etwas weiter auseinander, dabei sind die Werte aus den qRT-PCRs niedriger als die Werte aus dem Array. Die Werte zeigen trotzdem eine deutliche Erhöhung bzw. Verringerung der Cyclin D₁-Expression nach Actinomycin D- oder Brefeldin A-Expression.

5 Diskussion

5.1 Expression der HtrA-Proteine

Die Auswirkungen einer verminderten HtrA1-Expression sollten anhand von zwei Modellsystemen untersucht werden. Als erstes Modellsystem dienten primäre embryonale Fibroblasten aus HtrA1-*knockout*-Mäusen sowie den entsprechenden HtrA1-Wildtyp-Mäusen. Als zweites Modellsystem wurden Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480 verwendet, in denen die HtrA1-Expression durch ein shRNA-Konstrukt herunterreguliert wurde. Die Überprüfung, ob der *knockout* bzw. der *knockdown* von HtrA1 funktionell ist, war eine essentielle Voraussetzung für alle weiteren Experimente. Der Nachweis sollte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erbracht werden. Für die embryonalen Mausfibroblasten konnte mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass die beiden HtrA1-*knockout*-Linien 145(2) HtrA1^{-/-} und 145(3) HtrA1^{-/-} im Vergleich zur HtrA1-Wildtyp-Linie 288(1) HtrA1^{+/+} keine nachweisbare HtrA1-RNA-Expression zeigen. Mit dem durchgeführten WesternBlot konnte in den beiden HtrA1-*knockout*-Linien keine HtrA1-Expression mehr nachgewiesen werden (vgl. 4.1.1). Der *knockout* von HtrA1 in den primären embryonalen Mausfibroblasten ist also funktionell. Die HtrA1-Expression der, durch virale Transduktion hergestellten, Zelllinien SW480 shHtrA1 D3 und SW480 shHtrA1 S8 wurde mit der Expression in der Ursprungszelllinie SW480 parental sowie mit der Leervektorkontrolle SW480 plkoLV verglichen. Die HtrA1-Expression der Leervektorkontrolle ist im Vergleich mit der Ursprungszelllinie um ca. 38% vermindert. Dies könnte durch die virale Transduktion selbst und die anschließende Selektion bedingt sein. In den beiden shHtrA1-Zelllinien ist die HtrA1-Expression im Vergleich zur Leervektorkontrolle um 88 bzw. 78% reduziert. Diese Reduktion ist ausreichend, um Auswirkungen der verminderten HtrA1-Expression auf die Zelle zu untersuchen. Auf Proteinebene, die mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde, ist die Reduktion der HtrA1-Menge in der Zelllinie SW480 shHtrA1 S8 ebenfalls sehr deutlich. In der Zelllinie SW480 shHtrA1 D3 war HtrA1 nicht mehr nachweisbar (vgl. 4.1.2).

Zusätzlich zur HtrA1-Expression wurde auch die Expression von HtrA2 und HtrA3 in Zellen mit verminderter HtrA1-Expression untersucht. Damit sollte überprüft werden, ob eventuell eines der beiden anderen HtrA-Proteine durch die veränderte HtrA1-Expression beeinflusst wird. Dabei zeigte sich, dass die HtrA2-Expression in der HtrA1-*knockout*-Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1^{-/-} im Vergleich zur HtrA1-Wildtyp-

Linie 288(1) HtrA1+/+ deutlich um ca. 60% reduziert ist. In der Zelllinie SW480 shHtrA1 D3 dagegen ist die HtrA2-Expression nahezu unverändert. Dies zeigt, dass die HtrA2-Expression zumindest in primären Fibroblasten durch die HtrA1-Expression beeinflusst wird. Durch die Reduktion der HtrA2-Menge ist es aber nicht möglich, dass HtrA2 teilweise Funktionen von HtrA1 übernimmt. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse auch durch die reduzierte HtrA2-Expression beeinflusst sein können. Die HtrA3-Expression dagegen war sowohl in der Fibroblastenlinie 145(2) HtrA1-/- als auch in der Zelllinie SW480 shHtrA1 D3 deutlich erhöht. Insgesamt befand sich die HtrA3-Expression jedoch im Vergleich zur HtrA1-Expression auf einem sehr niedrigen Niveau. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die HtrA3-Expression bei einem Wegfall der HtrA1-Expression erhöht wird. Dies weist darauf hin, dass wichtige Funktionen von HtrA1 durch HtrA3 übernommen werden könnten. Durch die insgesamt sehr niedrige Expression von HtrA3 ist es jedoch unwahrscheinlich, dass alle Auswirkungen der reduzierten HtrA1-Expression durch die erhöhte HtrA3-Expression aufgefangen werden können.

Neben der Höhe der Expression von HtrA1 sollte auch die Lokalisation von HtrA1 in der Zelle untersucht werden (vgl. 4.2). Bisher ist bekannt, dass HtrA1 extrazellulär (Ajavi et al., 2008), an Mikrotubuli (Chien et al., 2009) oder in geringen Mengen auch im Kern (Clawson et al., 2008) lokalisiert sein kann. Außerdem wurde HtrA1 auch außerhalb der Zellen nachgewiesen (de Luca et al., 2004). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen, kommerziellen Antikörper gegen HtrA1 war ein Nachweis des Proteins in der Immunfluoreszenz nur in der Überexpressionszelllinie SW480 p50HtrA1 möglich. In der Ursprungszelllinie SW480 parental sowie in den HtrA1-Wildtyp-Fibroblasten konnte HtrA1 auf diesem Wege nicht nachgewiesen werden, da in beiden Fällen die Expression sehr niedrig ist. In den Zellen der Überexpressionszelllinie SW480 p50HtrA1 konnte keine Lokalisation von HtrA1 an den Mikrotubuli oder im Kern nachgewiesen werden. HtrA1 war in diesen Zellen primär im extrazellulären Raum und in intrazellulären Vesikeln in der Nähe des Kerns nachweisbar. Im Bereich des Zellkörpers zeigte sich eine diffuse Färbung. Diese Verteilung entspricht ungefähr dem bereits bekannten Verhältnis von 20% intra- und 80% extrazellulärem Protein (Grau et al., 2005). Die Färbung gegen HtrA1 war in den Zellzwischenräumen am stärksten. Dies spricht für eine eventuelle interzelluläre Signalwirkung von HtrA1. Die intrazellulären Vesikel könnten Golgi-Vesikel sein, die das HtrA1 in Richtung Zellmembran und intrazellulären Raum transportieren. Dafür

spricht auch das Vorhandensein einer Signalsequenz am N-Terminus, die das Protein für den Export über den sekretorischen Pfad markiert.

5.2 Eine verminderte HtrA1-Expression begünstigt die Transformation von normalen Zellen zu Tumorzellen

Es ist bekannt, dass die HtrA1-Expression in den verschiedensten Tumorarten herunterreguliert ist (Baldi et al., 2002; Shridhar et al.; 2002). Dies legt eine Funktion von HtrA1 in der malignen Transformation nahe. Diese wird charakterisiert durch die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, die Resistenz gegenüber antiproliferativen Signalen, die Vermeidung von Apoptose, Neoangiogenese, ein erhöhtes Replikationspotential sowie Invasion und Metastasierung. Begünstigt wird die maligne Transformation außerdem durch genomische Instabilität (vgl. 1.1). Bis jetzt wurde vor allem die Auswirkung einer verminderten HtrA1-Expression auf die Zytotoxizität bestimmter Chemotherapeutika untersucht (Chien et al., 2006) (vgl. 1.3.1). Die weiteren Folgen der verminderten HtrA1-Expression wurden bisher nicht ausreichend charakterisiert. In dieser Arbeit sollte deshalb die Auswirkung der verminderten HtrA1-Expression auf DNA-Gehalt, Proliferations-, Wachstums- und Migrationsverhalten untersucht werden.

Bei der durchflusszytometrischen Überprüfung der DNA-Menge in den HtrA1-*knockout*-Zellen 145(2) HtrA1^{-/-} wurde ein deutlich erhöhter DNA-Gehalt festgestellt. Dieser konnte auch bei der anschließenden Karyotypisierung bestätigt werden. Die meisten HtrA1-*knockout*-Zellen zeigten eine Verdopplung des Chromosomensatzes von 40 (2n) auf 80 (4n) Chromosomen, waren also tetraploid. Die Entstehung der Tetraploidie kann verschiedene Ursachen haben. Dazu gehört der Abbruch der Cytokinese, die Beendigung der Mitose ohne Durchführung von Anaphase und Cytokinese (*mitotic slippage*), eine fehlerhafte Chromosomensegregation, eine viral induzierte Zellfusion, Defekte bei der normalen Kinetochor-Mikrotubuli-Verbindung oder der funktionelle Verlust von verschiedenen Proteinen, wie z.B. des APC-Proteins (adenomatöser polyposer Colon) (Nguyen et al., 2009). Tetraploide Zellen weisen fast immer auch eine veränderte Anzahl von Centrosomen sowie eine dadurch bedingte veränderte Architektur der mitotischen Spindel auf. Dabei ist jedoch unklar, ob eine numerische Abberation der Centrosomen Ursache oder Begleiterscheinung der Tetraploidie ist (Sankaran und Parvin, 2006; Borel et al. 2002; Meraldi et al., 2002). Auch die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden hinsichtlich der Spindelarchitektur und der Centrosomenanzahl untersucht (vgl. 4.3.2 und 4.3.3). Dabei zeigten die

HtrA1-*knockout*-Zellen häufig eine sehr chaotische Spindelarchitektur mit mehreren Spindelpolen. Die größere Häufigkeit im Vergleich zu den HtrA1-Wildtyp-Zellen war statistisch signifikant. Begleitet wurde dieser Effekt durch eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an Centrosomen in den HtrA1-*knockout*-Zellen. Die HtrA1-*knockout*-Zellen zeigten also ein für tetraploide Zellen typisches Bild. Die meisten aggressiven Tumorzellen zeigen jedoch keine Tetraploidie sondern eine Aneuploidie, d. h. diese Zellen besitzen einen numerisch veränderten, aber keinen verdoppelten Chromosomensatz. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass die Tetraploidie ein intermediärer Status der Zellen ist, der eine große Rolle bei der Entstehung der Aneuploidie spielt (Olaharski et al., 2006; Storchova und Kuffer, 2008). Zum einen gibt es immer mehr *in vitro* Daten sowie einige Computermodelle aus denen hervorgeht, dass Aneuploidie durch Chromosomenverlust aus tetraploiden Intermediaten entstehen kann (Andreassen et al., 1996; Shackney et al., 1989). Zum anderen sind tetraploide Zellen in vielen frühen Stadien von soliden Tumoren nachweisbar (Dutrillaux et al., 1991; Shackney et al. 1995 a, b). Außerdem wurden Centrosomenanomalien in einigen Fällen als Nebenprodukt und nicht als Ursache der Tetraploidie gezeigt (Borel et al., 2002; Meraldi et al., 2002). Dadurch kommt es zu veränderten mitotischen Spindeln und zu Chromosomenmissegregation. Dies fördert in den tetraploiden Zellen die chromosomale Instabilität (CIN) (Gisselsson et al., 2008), ein wichtiges Merkmal von vielen Tumorzellen. Hinzu kommt auch noch ein vermehrtes Vorkommen von DNA-Strangbrüchen durch größere Kräfte in multipolaren Spindeln sowie die höhere Wahrscheinlichkeit von DNA-Schäden durch eine Überlastung des DNA-Reparatursystems (Storchova et al., 2006; Jannink et al., 1996). Eine weitere Studie zeigt außerdem, dass tetraploide Zellen im Gegensatz zu genetisch identischen, diploiden Zellen in Nacktmäusen Tumore induzieren können (Fujiwara et al. 2005). Dies alles spricht dafür, dass die primären embryonalen Mausfibroblasten durch den HtrA1-Verlust einen Phänotyp zeigen, der die maligne Transformation und die Entstehung von Aneuploidie begünstigen kann. Ob die Tetraploidie dabei durch die numerische Abberation der Centrosomen bedingt wird oder umgekehrt, muss dabei noch genauer untersucht werden.

Bei Herunterregulation eines Tumorsuppressorgens sollte das Proliferationsverhalten beeinflusst werden. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass die HtrA1-*knockout*-Zellen schneller proliferieren als die HtrA1-Wildtyp-Zellen (vgl. 4.3.4.) Da die HtrA1-*knockout*-Zellen unter den gleichen Kulturbedingungen gehalten wurden

wie die HtrA1-Wildtyp-Zellen, spricht dies dafür, dass die Zellen durch den HtrA1-Verlust einen Teil der zellulären Wachstumskontrolle verloren haben. Ob dies in Form einer Unabhängigkeit von Wachstumssignalen oder einer Resistenz gegenüber antiproliferativen Signalen geschieht (vgl. 1.1.1 und 1.1.2), konnte mit den verwendeten Methoden nicht geklärt werden. Diese Beobachtung stimmt auch mit bereits veröffentlichten Daten überein. Danach proliferieren Melanomzellen, die HtrA1 überexprimieren langsamer als entsprechende Zellen mit normaler HtrA1-Expression (Baldi et al., 2002).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die HtrA1-*knockout*-Zellen bei gleichen Kulturbedingungen eine längere Lebensdauer bzw. ein größeres Replikationspotential zeigen als die entsprechenden HtrA1-Wildtyp-Zellen (vgl. 4.3.4). Es wird angenommen, dass es zwei Mechanismen in der Zelle gibt, die das Replikationspotential begrenzen und die zelluläre Seneszenz begünstigen. Der erste Mechanismus ist abhängig von der Länge der Telomere und registriert dadurch die Zahl der Zellverdopplungen. Er wird in vielen Tumorzellen durch eine erhöhte Telomeraseaktivität umgangen (Stewart und Weinberg, 2006). Der zweite Mechanismus ist von den beiden Tumorsuppressorgenen Ink4a (p16^{Ink4}) und ARF abhängig, die sich einen Genlocus teilen. Er registriert die Stimulation der Zelle durch mitogene Faktoren und lässt sich in der Zellkultur durch Vermeidung von mitogener Überstimulation (serumfreie Bedingungen) umgehen (Ramirez et al., 2001; Woo und Poo, 2004; Collado, Blasco und Serrano, 2007). Welcher Mechanismus in den HtrA1-*knockout*-Zellen zu der verlängerten Lebensdauer beiträgt, muss mit weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die Beobachtung selbst gibt aber einen weiteren Hinweis darauf, dass ein Verlust der HtrA1-Expression zur Transformation von primären Zellen beiträgt.

Ein weiteres Merkmal transformierter Zellen ist eine verbesserte Migrationsfähigkeit. Deshalb wurde das Migrationsverhalten der primären embryonalen Fibroblasten mit Hilfe eines 2D-Wundheilungsassays untersucht. Dabei zeigte sich, dass die HtrA1-*knockout*-Zellen entgegen der Erwartung wesentlich schlechter migrierten als die HtrA1-Wildtyp-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu bereits publizierten Daten. Chien und Kollegen untersuchten das Migrationsverhalten einer metastatischen Ovarialkarzinomzelllinie (SKOV-3), deren HtrA1-Expression mit Hilfe von siRNA herunterreguliert wurde. SKOV-3-Zellen mit verminderter HtrA1-Expression zeigte eine erhöhte Migration. Wurde HtrA1 in den gleichen Zellen reexprimiert, so verringerte sich die Migrationsgeschwindigkeit wieder (Chien et al., 2009). Ajayi und Kolle-

gen untersuchten die Auswirkungen einer Überexpression von HtrA1 auf das Migrationsverhalten der etablierten Trophoblastenzelllinie HTR-8/SVneo. Sie stellten fest, dass die Überexpression von HtrA1 die Migration der Trophoblastenzelllinie inhibierte (Ajayi et al., 2008). Der Widerspruch zwischen den publizierten Daten und den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lässt sich am ehesten auf den großen Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien zurückführen. Da es sich bei der SKOV-3-Zelllinie um eine etablierte Ovarialkarzinomzelllinie handelt, weisen die Zellen vielfältige genetische Veränderungen auf, die gemeinsam mit der verminderten HtrA1-Expression zum veränderten Migrationsverhalten beitragen können. Die in der zweiten Arbeit verwendete Trophoblastenzelllinie HTR8/SVneo wurde durch einbringen des SV40 großen T-Antigens immortalisiert. Dadurch werden in den transformierten Zellen mehrere verschiedene Signalwege beeinflusst (Ahuja, Sáenz-Robles und Pipas, 2005). Dies kann gemeinsam mit der erhöhten Expression von HtrA1 das Migrationsverhalten der Trophoblastenzelllinie negativ beeinflussen. Die in dieser Arbeit verwendeten embryonalen Mausfibroblasten stammen nicht aus Tumoren und wurden nicht durch Virustransformation immortalisiert. Der Einfluss von HtrA1 auf das Migrationsverhalten scheint sich daher grundsätzlich in transformierten und nicht-transformierten Zellen zu unterscheiden. Während HtrA1 in transformierten Zellen inhibierend auf die Migration wirkt und damit funktionell einem Tumorsuppressor entspricht, scheint HtrA1 in nicht-transformierten, primären Zellen die Migration zu fördern. Die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Migrationsfähigkeit der HtrA1-*knockout*-Zellen entspricht dabei nicht dem durch die anderen Ergebnisse vermuteten Phänotyp einer transformierten Zelle.

Da Mutationen, die den Zellzyklus beschleunigen, häufig in kleineren Zellen resultieren (Stocker und Hafen, 2000), wurde in dieser Arbeit auch die Auswirkung der verringerten HtrA1-Expression auf den Zelldurchmesser und das Zellvolumen untersucht. Dabei zeigte sich, dass embryonale Mausfibroblasten, die kein HtrA1 mehr exprimieren einen kleineren Durchmesser und ein verringertes Zellvolumen aufweisen (vgl. 4.3.6). Eine reduzierte Zellgröße kann z.B. durch eine vermehrte Expression der durch die Gene TSC1 und TSC2 kodierten Proteine verursacht werden. Diese wiederum sind abhängig von der Aktivität des PI3K-Signalwegs (Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase) und damit von der Aktivität der Insulinrezeptoren. Durch die große Ähnlichkeit eines Teils des N-Terminus von HtrA1 zu den IGFBNs, könnte HtrA1 auf diesem Wege Einfluss auf die Zellgröße nehmen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Auswirkung des HtrA1-*knockouts* in primären embryonalen Mausfibroblasten in dieser Arbeit geben Grund zu der Annahme, dass der Verlust von HtrA1 in normalen Zellen die Transformation zu Tumorzellen fördern kann.

5.3 Die durch den HtrA1-Verlust ausgelöste Polyploidie in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 ist abhängig von der Zelldichte

Auch in den hier untersuchten shHtrA1-Derivaten der Kolonkarzinomzelllinie SW480 kommt es durch die verminderte HtrA1-Menge zu einer Tetraploidie (vgl. 4.4.1). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Entstehung der Tetraploidie abhängig von der Zelldichte ist (vgl. 4.4.2). Erst wenn den Zellen vermehrt Zell-Zell-Kontakte erlaubt wurden, bildete sich die Tetraploidie heraus. Ein ähnliches Phänomen wurde bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben. Es liegt aber nahe zu vermuten, dass hier die extrazelluläre Lokalisation von HtrA1 eine Rolle spielt. HtrA1 könnte dabei als Sensor-molekül fungieren, welches die Nähe zu anderen Zellen detektiert. Dabei muss dann ein Signalweg angesprochen werden, der entweder für die Kontrolle der DNA-Replikation oder für den korrekten und vollständigen Ablauf der Zellteilung verantwortlich ist. Fehlt HtrA1, so kann es bei zu großer Zelldichte zu einer unkontrollierten Replikation der DNA kommen. Alternativ könnten Störungen der Zellteilung auftreten. Insgesamt spricht dieses Ergebnis dafür, dass HtrA1 eine Rolle in der Kontaktinhibition des Zellwachstums spielen könnte. Die Kontaktinhibition des Zellwachstums ist eine generelle Eigenschaft von primären, kultivierten Zellen. Dabei blockieren zunehmende Zell-Zell-Kontakte in adherenten Zellen die Wachstumsfaktor- und Integrin-vermittelten Proliferationsstimuli (Nelson und Daniel, 2002). Krebszellen dagegen verlieren in der Regel diese Kontaktinhibition (Abercrombie, 1979; Martz und Steinberg, 1972). Die in dieser Arbeit verwendeten SW480-Zellen zeigten in Versuchen zum Wachstumsverhalten ebenfalls keine Kontaktinhibition. HtrA1 spielt also nicht direkt bei der Kontaktinhibition der Proliferation eine Rolle, sondern beeinflusst Mechanismen, die trotz ausgeschalteter Kontaktinhibition bei hoher Zelldichte für einen korrekten Ablauf der Zellteilung sorgen.

5.4 Modell für die Regulation des p53-Signalwegs durch HtrA1

Der *knockdown* von HtrA1 in Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480 führt zu einer verminderten RNA-Expression von p21. p21 wird transkriptionell sowohl durch den TGF β -Signalweg als auch durch p53 reguliert. Da die Funktion des TGF β -Signalwegs in der verwendeten Kolonkarzinomzelllinie SW480 durch Verlust von

Smad4 gestört ist (Woodford-Richens et al., 2001), wurde die Auswirkung des HtrA1-Verlusts auf den p53-Signalweg untersucht. Dabei zeigte sich, dass die p53-Expression auf RNA-Ebene nahezu unverändert bleibt. Auf Proteinebene dagegen zeigte sich eine deutliche Verringerung der p53-Proteinmenge in den SW480 shHtrA1-Zelllinien. Da p53 vor allem durch die Ubiquitinligase Mdm2 reguliert wird (vgl. Abb. 1-3) wurde auch die Expression von Mdm2 untersucht. Die RNA-Expression von Mdm2 ist in allen SW480-Zelllinien unverändert. Die Proteinmenge dagegen nimmt in den beiden shHtrA1-Zelllinien deutlich zu (vgl. 4.4.3.). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Protein-Expression der Ubiquitin-Ligase Mdm2 durch HtrA1 reguliert wird. Unterstützt wird diese Theorie durch weitere unveröffentlichte Daten, die zeigen, dass HtrA1 dazu in der Lage ist ein Fragment von Mdm2 zu proteolysieren (M. Campioni, unveröffentlichte Daten). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein Modell für die Regulation des p53-Signalwegs durch HtrA1 ableiten.

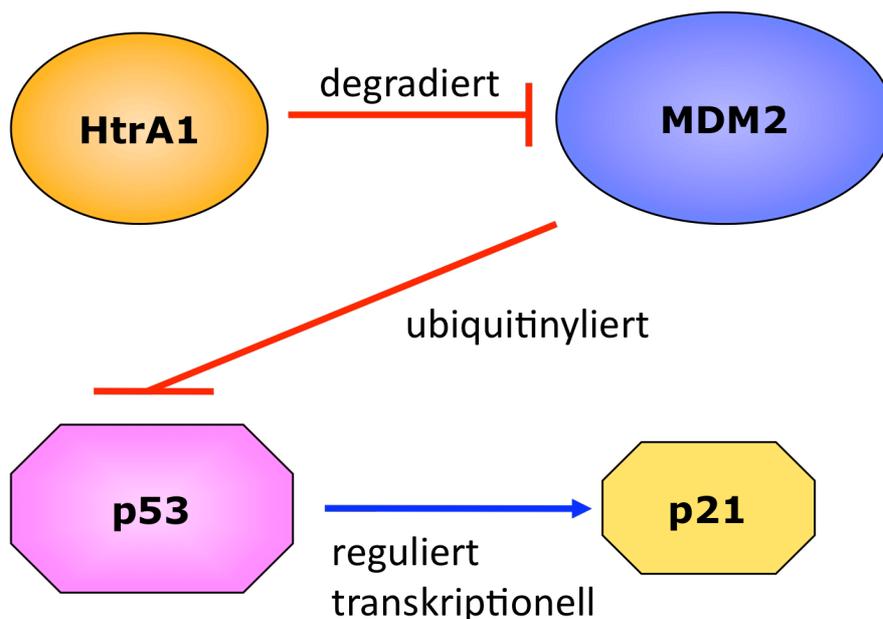


Abb. 5-1 Modell für die Regulation des p53-Signalwegs durch HtrA1

HtrA1 ist in der Lage Mdm2 zu proteolysieren. Bei verminderter HtrA1-Expression kommt es also zu einer erhöhten Mdm2-Expression. Dadurch wird p53 vermehrt ubiquitinyliert und abgebaut. In der Folge nimmt die p21-Expression ab.

p53 fungiert als Transkriptionsfaktor für p21. Werden in der Zelle beispielsweise DNA-Schäden detektiert, so wird p53 durch Phosphorylierung aktiviert und transaktiviert dann den Promotor von p21. Dadurch kommt es dann zum Zellzyklusarrest. Im hypophosphorylierten Zustand bindet p53 an Mdm2, wird von diesem ubiquitinyliert und vom Proteasom degradiert. Wenn HtrA1 in der Lage ist die Proteinmenge von

Mdm2 zu regulieren, so kommt es in Folge einer verminderten HtrA1-Expression zu einer Erhöhung der Mdm2-Menge und damit zu einer vermehrten Instabilisierung von p53. Dadurch wird die p21-Expression vermindert und der p53-abhängige Zellzyklusarrest verhindert.

Bisher sind zwei Regulationswege für Mdm2 bekannt. Einerseits kann Mdm2 während der p53-abhängigen Apoptose durch eine Caspase geschnitten werden. Dabei bleibt jedoch die p53-bindende Domäne erhalten (Chen et al., 1997; Erhardt et al., 1997; Gentiletti et al., 2002; Juven-Gershon und Oren, 1999). Andererseits wird Mdm2 durch Bindung von p14ARF deaktiviert und destabilisiert (Zhang, Xiong und Yarbrough, 1998). Die Beeinflussung der Mdm2-Proteinmenge durch HtrA1 könnte also ein weiterer wichtiger Regulationsweg des p53-Signalwegs sein.

5.5 Die HtrA1-Proteinmenge wird zellzyklusabhängig reguliert

Da HtrA1 vermutlich an einigen wichtigen Prozessen während des Zellzyklus beteiligt ist, sollte auch untersucht werden, ob die HtrA1-Expression zellzyklusabhängig reguliert ist. Dazu wurde sowohl die RNA-Menge als auch die Protein-Menge von HtrA1 in HtrA1-Wildtyp-Fibroblasten und in der SW480-Zelllinie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die HtrA1-Menge unabhängig von der untersuchten Zelllinie auf RNA-Ebene während aller Zellzyklusphasen nahezu konstant bleibt. Lediglich in der G₂/M-Phase ist die RNA-Menge geringfügig reduziert. Auf Proteinebene dagegen verändert sich die HtrA1-Menge sehr deutlich in Abhängigkeit von den Zellzyklusphasen. Die HtrA1-Protein-Expression während der G₂/M-Phase ist ungefähr doppelt so hoch wie während der anderen Zellzyklusphasen. Zur G₁-Phase nimmt die Proteinmenge dann wieder deutlich ab (vgl. 4.5). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die HtrA1-Proteinmenge nicht transkriptionell sondern post-transkriptionell reguliert wird. Dabei könnte HtrA1 beispielsweise nach der Mitose verstärkt ubiquitinyliert und in der Folge degradiert werden. Viele andere Regulatoren des Zellzyklus werden durch Ubiquitinligasen reguliert. So werden z.B. alle mitotischen Cycline und einige wichtige Transkriptionsfaktoren über den Ubiquitin-Signalweg in Abhängigkeit von den Zellzyklusphasen abgebaut (Nakayama und Nakayama, 2006; Hateboer et al., 1996). Dabei spielen die beiden Ubiquitin-Ligase-Komplexe SCF (Skp1-Cul1-F-Box-Protein) und APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosom*) die Hauptrolle. Der SCF-Komplex ist hauptsächlich zwischen G₁-Phase und früher M-Phase aktiv. Der APC/C-Komplex dagegen ist zwischen der Anaphase der Mitose und dem Ende der G₁-Phase aktiv (Nakayama und Nakayama, 2006).

Ob HtrA1 tatsächlich über den Ubiquitin-Signalweg degradiert wird, muss mit weiteren Experimenten untersucht werden.

5.6 Mögliche Regulationswege von HtrA1

Die Proteine der HtrA-Familie werden oft mit der zellulären Stressantwort in Verbindung gebracht. Da es bis jetzt, außer einer epigenetischen Regulation, kaum Hinweise auf den Regulationsmechanismus von HtrA gibt, sollte versucht werden, eine differentielle Regulation von HtrA1 durch zellulären Stress zu erreichen. Diese differentielle Regulation sollte dann mittels eines *cDNA-Microarrays* untersucht werden. Hauptziel war es dabei weitere Gene zu identifizieren, die unter den gewählten Bedingungen eine ähnliche Regulation der Expression wie HtrA1 zeigen. Um sicherzugehen, dass die differentielle Regulation der gefundenen Gene ein genereller Effekt ist und nicht spezifisch für die verwendete Zelllinie ist, wurde zur Bestätigung der Treffer aus dem *Array* eine weitere Zelllinie unter den gleichen Bedingungen untersucht. Nur wenn die differentielle Regulation durch den zellulären Stress in beiden Zelllinien nachweisbar ist, werden die Treffer als bestätigt angenommen.

Für uns besonders interessant waren Gene, die bei der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation oder beim Aufbau des Zytoskeletts eine Rolle spielen. Zur weiteren Einschränkung der Auswahl wurden außerdem Ergebnisse eines weiteren *Arrays* herangezogen (vgl. 4.6.2). Letztendlich wurden die Gene Cyclin D₁, CDK2, IGFBP2, Fos und Jun ausgewählt. Cyclin D₁ und CDK2 wurden ausgewählt, da sie eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen. IGFBP2 wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum N-Terminus von HtrA1 ausgewählt. Die Gene Fos und Jun sind bekannte Onkogene und bilden gemeinsam den Transkriptionsfaktor AP-1, der auch durch zellulären Stress aktiviert werden kann. Von den fünf ausgewählten Genen ließ sich lediglich das Expressionsmuster von Cyclin D₁ und IGFBP2 in den beiden verwendeten Zelllinien bestätigen (vgl. 4.6.3). Dabei ist die Herauf- bzw. Herunterregulation der Expression unter den gewählten Bedingungen im *cDNA-Microarray* und bei der Bestätigung mittels qRT-PCR ähnlich groß (vgl. Tabelle 4-5). Nach Bestätigung der beiden Gene Cyclin D₁ und IGFBP2 soll nun nach Ähnlichkeiten bezüglich der Regulationsmechanismen dieser Gene gesucht werden. Die differentielle Regulation von IGFBP2 wird bis jetzt hauptsächlich mit Vorgängen im Zusammenhang mit Diabetes in Verbindung gebracht (Chen und Arnqvist; 1994). In Leber- und Knochenzellen konnte außerdem eine Regulation durch Insulin und Retinolsäure gezeigt werden (Schmid et al., 1992). Weitere transkriptionelle Regulati-

onswege sind bisher nicht publiziert.

Cyclin D₁ wird vor allem durch Mitogen-aktivierte Wachstumsfaktoren reguliert. Dabei spielt der Ras-Raf-MAPK-ERK-Signalweg eine große Rolle. Dieser kann die Expression von AP-1 Transkriptionsfaktoren wie Jun, Fos und ATFs (aktivierende Transkriptionsfaktoren) stimulieren (Balmanno und Cook, 1999; Shaulian und Karin, 2001). Wachstumsfaktorabhängige Ras-Aktivierung kann außerdem mittels des Transkriptionsfaktors Sp1 die Cyclin D₁-Expression fördern (Marampon et al., 2008). Auch NF- κ B kann die Cyclin D₁-Expression induzieren (Klein et al., 2007; Yang et al., 2008). Die Aktivität von NF- κ B kann dabei durch PI3K-abhängige Komplexbildung mit JunD verstärkt werden (Toualbi-Abed et al., 2008). Neben Wachstumsfaktoren beeinflussen auch Zytokine die Expression von Cyclin D₁. Dabei wird der JAK-STAT-Signalweg (Janus-aktivierte Kinase; Signal *Transducer* und Aktivator der Transkription) aktiviert (Wang et al., 2007; Gu et al., 2008). Zusätzlich können auch Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) durch Aktivierung der Fokalen Adhäsions Kinase (FAK) die Cyclin D₁-Expression beeinflussen. Untersucht man die mögliche Promotorregion von HtrA1 hinsichtlich Transkriptionsfaktorbindestellen, so sind dort u.a. Bindestellen für AP-1 und Sp1 zu finden. Auch mit dem JAK-STAT-Signalweg (unveröffentlichte Daten) und der FAK (J. Chien, unveröffentlichte Daten) wurde HtrA1 bereits in Verbindung gebracht. Es erscheint daher lohnenswert, sich bei der Suche nach neuen Regulationswegen von HtrA1 intensiver mit den oben genannten Transkriptionsfaktoren und Signalwegen zu beschäftigen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Die humane Serinprotease HtrA1 gehört zur hochkonservierten Familie der HtrA-Proteine, deren Mitglieder in vielen verschiedenen Organismen nachgewiesen wurden. Die Mitglieder der HtrA-Familie werden dabei häufig mit der zellulären Stressantwort in Verbindung gebracht. Die humanen HtrAs weisen mit Ausnahme von HtrA2 große strukturelle Ähnlichkeiten auf. HtrA1 und HtrA3 wurden mit verschiedenen Tumorarten in Verbindung gebracht. HtrA1 wurde dabei vermehrt eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben und mit der malignen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht. Intrazellulär kann HtrA1 an Mikrotubuli nachgewiesen werden. Diese Lokalisation bleibt auch während der Spindelbildung in der Mitose erhalten. In dieser Arbeit sollte die Auswirkung einer reduzierten HtrA1-Expression auf verschiedene Zellprozesse, die hinsichtlich einer Rolle als Tumorsuppressor und bei der malignen Transformation von Bedeutung sind, untersucht werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die HtrA1-Expression in den verwendeten Modellsystemen reduziert ist. Außerdem ist HtrA1 sowohl extra- als auch intrazellulär lokalisiert, wenn auch die Lokalisation an Mikrotubuli mit dem verwendeten Antikörper nicht gezeigt werden konnte. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen sowie das Zellteilungsverhalten von HtrA1-*knockout*-Fibroblasten untersucht. Dabei zeigten die Zellen nach einigen Passagen eine deutliche Verschiebung des DNA-Gehalts von einem diploiden hin zu einem tetraploiden Chromosomensatz. Dieser wurde von einer erhöhten Centrosomenzahl und dem Vorkommen von multipolaren Spindeln begleitet. Es konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die Centrosomenanomalie eine Ursache oder eine Konsequenz der Tetraploidie ist. Allerdings sind sowohl die Tetraploidie als auch die erhöhte Anzahl an Centrosomen ein deutlicher Hinweis für eine chromosomale Instabilität und können Merkmal einer beginnenden malignen Transformation sein. Weitere Hinweise auf den Einfluss der reduzierten HtrA1-Expression auf die maligne Transformation gaben auch die Untersuchungen bezüglich Proliferationsverhalten und Zellgröße. Zellen ohne HtrA1 proliferieren schneller als Zellen mit intakter HtrA1-Expression und zeigen außerdem eine verlängerte Lebensdauer. Zusätzlich ist die Zellgröße verringert. Dies gibt Hinweise darauf, dass sich HtrA1-*knockout*-Zellen den normalen zellulären Kontrollmechanismen für Wachstum und Replikationspotential entziehen. Des Weiteren wurde das Migrationsverhalten der

HtrA1-*knockout*-Fibroblasten untersucht. Dabei zeigte sich, dass in primären Zellen der Verlust der HtrA1-Expression zu einem verringerten Migrationsvermögen der Zellen führt. Dies steht allerdings im Widerspruch zu veröffentlichten Daten. Dieser Unterschied kann nur durch den genetischen Unterschied zwischen primären und bereits transformierten Zellen erklärt werden. Das verringerte Migrationsvermögen von HtrA1-*knockout*-Zellen widerspricht dem Phänotyp von transformierten Zellen.

Auch in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 wurde die Auswirkung des Verlusts der HtrA1-Expression untersucht. SW480-Zellen mit verminderter HtrA1-Expression zeigen ebenfalls eine ausgeprägte Verschiebung von einem diploiden hin zu einem tetraploiden Chromosomensatz. Diese Verschiebung ist allerdings abhängig von der Zelldichte. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass HtrA1 ein extrazelluläres Sensormolekül für die Zelldichte sein könnte. Des Weiteren zeigte sich, dass die HtrA1-Expression einen Einfluss auf die Höhe der p21-, p53- und Mdm2-Expression hat. Daraus wurde ein Modell für die Regulation des p53-Signalwegs durch HtrA1 abgeleitet. Der proteolytische Abbau von Mdm2 durch HtrA1 erlaubt demnach eine Stabilisierung von p53 und damit die Transkription von p21.

Zusätzlich wurde eine zellzyklusabhängige Regulation der HtrA1-Proteinmenge sowohl in primären Mausfibroblasten als auch in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 gefunden. Dies legt eine Regulation der HtrA1-Proteinmenge durch Ubiquitinligasen nahe.

Durch Induktion der zellulären Stressantwort und Untersuchung der daraus resultierenden differentiellen Genregulation mittels eines cDNA-*Microarrays* sollten Gene identifiziert werden, die ein ähnliches Expressionsmuster wie HtrA1 zeigen. Aus den bekannten Regulationsmechanismen dieser Gene soll dann auf mögliche Regulationswege von HtrA1 geschlossen werden. Ein aussichtsreicher Kandidat hierfür ist Cyclin D₁, da einige der Transkriptionsfaktoren, die die Cyclin D₁-Expression induzieren, auch Bindungsstellen im möglichen HtrA1-Promotor aufweisen.

6.2 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HtrA1 eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation und Tumorprogression spielt. Die exakten Mechanismen, mit denen HtrA1 das Proliferations-, Wachstums- und Migrationsverhalten sowie die chromosomale Stabilität beeinflusst müssen jedoch noch weitreichender untersucht werden. Dazu ist es wichtig, HtrA1 biochemisch genauer hinsichtlich Temperatur-, pH- und

Salztoleranz zu charakterisieren. Außerdem sollten weitere Substrate identifiziert werden. Da aber nicht nur die proteolytische Aktivität von HtrA1 von Bedeutung ist, müssen vor allem Interaktionspartner von HtrA1 innerhalb und außerhalb der Zelle identifiziert werden. Ein Hauptaugenmerk sollte dabei auf Proteine gelegt werden, die zur genomischen Stabilität beitragen oder bei der Centrosomenduplikation eine Rolle spielen.

Bisher ist nicht bekannt, ob HtrA1 auf irgendeine Weise posttranslational modifiziert wird. So wäre es beispielsweise möglich, dass die Aktivität bzw. Bindungsfähigkeit von HtrA1 durch Phosphorylierung reguliert wird. Außerdem sollte die Möglichkeit des Ubiquitin-vermittelten Abbaus von HtrA1 durch das Proteasom genauer untersucht werden. Dabei sollte auch geklärt werden, ob die Ubiquitinligasen SCF oder APC/C für die zellzyklusabhängige Proteinexpression verantwortlich sind.

Die durch den HtrA-Verlust ausgelöste Polyploidie in den SW480-Zellen ist Abhängig von der Zelldichte. Hierbei wäre es interessant zu wissen, ob dieser Effekt durch intra- oder extrazelluläres HtrA1 verursacht wird. Dazu könnte ein HtrA1-Konstrukt ohne Signalsequenz hergestellt werden und in die Zellen eingebracht werden. Die Auswirkungen dieser ausschließlich intrazellulären HtrA1-Expression können dann mit den Auswirkungen des HtrA1-Verlust verglichen werden.

Um das in dieser Arbeit aufgestellte Modell zur Regulation des p53-Signalwegs durch HtrA1 zu bestätigen, sollte die Interaktion zwischen HtrA1 und Mdm2 genauer untersucht werden. Dabei ist es wichtig eine Kollokalisierung in der Zelle nachzuweisen, sowie die Bindung zwischen den beiden Proteinen zu zeigen. Auch der proteolytische Abbau von Mdm2 durch HtrA1, der bisher nur für ein Fragment von Mdm2 gezeigt wurde, muss für das ganze Protein nachgewiesen werden. Um den direkten Einfluss von HtrA1 auf Mdm2 und den p53-Signalweg besser zu charakterisieren, könnte der Einsatz eines induzierbaren RNAi-Systems für HtrA1 nützlich sein.

Um mögliche Regulationswege von HtrA1 zu identifizieren, ist es wichtig die Promotorregion zu definieren und die dort vorhandenen Regulationselemente und Bindestellen von Transkriptionsfaktoren zu benennen. Dies könnte weitere Hinweise darauf geben, in welche Signalkaskaden HtrA1 eingebunden ist. Die Ergebnisse des *cDNA-Microarrays* können dabei wertvolle Hinweise geben.

7 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M. (1979). Contact inhibition and malignancy. *Nature* *281*, 259-262.
- Ahuja, D., Sáenz-Robles, M. T., and Pipas, J. M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* *24*, 7729-7745.
- Ajayi, F., Kongoasa, N., Gaffey, T., Asmann, Y. W., Watson, W. J., Baldi, A., Lala, P., Shridhar, V., Brost, B., and Chien, J. (2008). Elevated expression of serine protease HtrA1 in preeclampsia and its role in trophoblast cell migration and invasion. *Am J Obstet Gynecol* *199*, 557.e551-510.
- Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E. A., and Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* *426*, 570-574.
- Andreassen, P. R., Martineau, S. N., and Margolis, R. L. (1996). Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutat Res* *372*, 181-194.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricalà, C., Amantea, A., Noonan, D. M., Albini, A., *et al.* (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* *21*, 6684-6688.
- Balmano, K., and Cook, S. J. (1999). Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* *18*, 3085-3097.
- Beilina, A., Van Der Brug, M., Ahmad, R., Kesavapany, S., Miller, D. W., Petsko, G. A., and Cookson, M. R. (2005). Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*, 5703-5708.
- Bicknell, K. A., Surry, E. L., and Brooks, G. (2003). Targeting the cell cycle machinery for the treatment of cardiovascular disease. *J Pharm Pharmacol* *55*, 571-591.
- Blangy, A., Lane, H. A., d'Hérin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* *83*, 1159-1169.
- Boddy, M. N., and Russell, P. (1999). DNA replication checkpoint control. *Front Biosci* *4*, D841-848.
- Borel, F., Lohez, O. D., Lacroix, F. B., and Margolis, R. L. (2002). Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *99*, 9819-9824.
- Bowden, M. A., Di Nezza-Cossens, L. A., Jobling, T., Salamonsen, L. A., and Nie, G. (2006). Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing

grades of human endometrial cancer. *Gynecol Oncol* *103*, 253-260.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.

Brooks, G., Poolman, R. A., and Li, J. M. (1998). Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc Res* *39*, 301-311.

Brown, A. L., Lee, C. H., Schwarz, J. K., Mitiku, N., Piwnica-Worms, H., and Chung, J. H. (1999). A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 3745-3750.

Bryan, T. M., and Cech, T. R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 318-324.

Burgess, T. L., Skoufias, D. A., and Wilson, L. (1991). Disruption of the Golgi apparatus with brefeldin A does not destabilize the associated deetyrosinated microtubule network. *Cell Motil Cytoskeleton* *20*, 289-300.

Canman, C. E., and Lim, D. S. (1998). The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* *17*, 3301-3308.

Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249-257.

Carroll, P. E., Okuda, M., Horn, H. F., Biddinger, P., Stambrook, P. J., Gleich, L. L., Li, Y. Q., Tarapore, P., and Fukasawa, K. (1999). Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* *18*, 1935-1944.

Chambers, A. F., and Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* *89*, 1260-1270.

Chaturvedi, P., Eng, W. K., Zhu, Y., Mattern, M. R., Mishra, R., Hurle, M. R., Zhang, X., Annan, R. S., Lu, Q., Faucette, L. F., *et al.* (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* *18*, 4047-4054.

Chen, L., Marechal, V., Moreau, J., Levine, A. J., and Chen, J. (1997). Proteolytic cleavage of the mdm2 oncoprotein during apoptosis. *J Biol Chem* *272*, 22966-22973.

Chen, Y., and Arnqvist, H. J. (1994). Differential regulation of insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 mRNA in muscle tissues and liver by diabetes or fasting. *J Endocrinol* *143*, 235-242.

Chien, J. (2006). Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation* *116*, 1994-2004.

Chien, J., Campioni, M., Shridhar, V., and Baldi, A. (2009a). HtrA serine proteases as

potential therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 451-468.

Chien, J., Ota, T., Aletti, G., Shridhar, R., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A., and Shridhar, V. (2009b). Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration. *Molecular and Cellular Biology*.

Clausen, T., Southan, C., and Ehrmann, M. (2002). The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* 10, 443-455.

Clawson, G. A., Bui, V., Xin, P., Wang, N., and Pan, W. (2008). Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. *J Cell Biochem* 105, 81-88.

Collado, M., Blasco, M. A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223-233.

Colman, M. S., Afshari, C. A., and Barrett, J. C. (2000). Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* 462, 179-188.

Cordon-Cardo, C. (1995). Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 147, 545-560.

Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Caddle, S. D., Haber, D. A., and Weinberg, R. A. (1998). Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 16, 1217-1222.

Coussens, L. M., and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 3, 895-904.

Cui, W., Taub, D. D., and Gardner, K. (2007). qPrimerDepot: a primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic Acids Research* 35, D805-D809.

Datto, M. B., Hu, P. P., Kowalik, T. F., Yingling, J., and Wang, X. F. (1997). The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 17, 2030-2037.

De Luca, A., De Falco, M., Severino, A., Campioni, M., Santini, D., Baldi, F., Paggi, M. G., and Baldi, A. (2003). Distribution of the serine protease HtrA1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 51, 1279-1284.

Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 8, 438-450.

Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., and Aaronson, S. A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237, 178-182.

Dutrillaux, B., Gerbault-Seureau, M., Remvikos, Y., Zafrani, B., and Prieur, M. (1991). Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Res Treat* 19, 245-255.

- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* *243*, 934-937.
- Ehrmann, M., and Clausen, T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* *38*, 709-724.
- Eliceiri, B. P., and Cheresh, D. A. (1999). The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* *103*, 1227-1230.
- Erhardt, P., Tomaselli, K. J., and Cooper, G. M. (1997). Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* *272*, 15049-15052.
- Fava, F., Raynaud-Messina, B., Leung-Tack, J., Mazzolini, L., Li, M., Guillemot, J. C., Cachot, D., Tollon, Y., Ferrara, P., and Wright, M. (1999). Human 76p: A new member of the gamma-tubulin-associated protein family. *J Cell Biol* *147*, 857-868.
- FOULDS, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* *14*, 327-339.
- Fuchs, E., and Cleveland, D. W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* *279*, 514-519.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E. V., Bronson, R. T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* *437*, 1043-1047.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., and Vande Woude, G. F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* *271*, 1744-1747.
- Fynan, T. M., and Reiss, M. (1993). Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* *4*, 493-540.
- Galaktionov, K., and Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* *67*, 1181-1194.
- Gartel, A. L., Serfas, M. S., and Tyner, A. L. (1996). p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* *213*, 138-149.
- Gebäck, T., Schulz, M. M. P., Koumoutsakos, P., and Detmar, M. (2009). TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques* *46*, 265-274.
- Gentiletti, F., Mancini, F., D'Angelo, M., Sacchi, A., Pontecorvi, A., Jochemsen, A. G., and Moretti, F. (2002). MDMX stability is regulated by p53-induced caspase cleavage in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Oncogene* *21*, 867-877.
- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* *285*, 1028-

1032.

Gisselsson, D., Håkanson, U., Stoller, P., Marti, D., Jin, Y., Rosengren, A. H., Stewénius, Y., Kahl, F., and Panagopoulos, I. (2008). When the genome plays dice: circumvention of the spindle assembly checkpoint and near-random chromosome segregation in multipolar cancer cell mitoses. *PLoS ONE* *3*, e1871.

Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132-138.

Golan, A., Yudkovsky, Y., and Hershko, A. (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* *277*, 15552-15557.

Gray, C. W., Ward, R. V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K. G., West, A., *et al.* (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* *267*, 5699-5710.

Gu, J., Li, G., Sun, T., Su, Y., Zhang, X., Shen, J., Tian, Z., and Zhang, J. (2008). Blockage of the STAT3 signaling pathway with a decoy oligonucleotide suppresses growth of human malignant glioma cells. *J Neurooncol* *89*, 9-17.

Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., and Pines, J. (1999). Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* *9*, 680-689.

Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* *400*, 464-468.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* *166*, 557-580.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353-364.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* *371*, 257-261.

Harper, J. V., and Brooks, G. (2005). The mammalian cell cycle: an overview. *Methods Mol Biol* *296*, 113-153.

Harper, J. W., Burton, J. L., and Solomon, M. J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & Development* *16*, 2179-2206.

Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* *17*, 1187-1198.

Hasselblatt, H., Kurzbauer, R., Wilken, C., Krojer, T., Sawa, J., Kurt, J., Kirk, R., Ha-

- senbein, S., Ehrmann, M., and Clausen, T. (2007). Regulation of the sigmaE stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. *Genes Dev* 21, 2659-2670.
- Hateboer, G., Kerkhoven, R. M., Shvarts, A., Bernards, R., and Beijersbergen, R. L. (1996). Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes & Development* 10, 2960-2970.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry Mosc* 62, 1180-1190.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Hinchcliffe, E. H., and Sluder, G. (2001). Centrosome reproduction in *Xenopus* lysates. *Methods Cell Biol* 67, 269-287.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J* 12, 53-63.
- Hofmann, F., Martelli, F., Livingston, D. M., and Wang, Z. (1996). The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Development* 10, 2949-2959.
- Jannink, G., Duplantier, B., and Sikorav, J. L. (1996). Forces on chromosomal DNA during anaphase. *Biophys J* 71, 451-465.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T. J., and Hunter, T. (1999). Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *EMBO J* 18, 5703-5713.
- Kato, M. V. (2000). A secreted tumor-suppressor, mac25, with activin-binding activity. *Mol Med* 6, 126-135.
- Kato, M. V., Sato, H., Tsukada, T., Ikawa, Y., Aizawa, S., and Nagayoshi, M. (1996). A follistatin-like gene, mac25, may act as a growth suppressor of osteosarcoma cells. *Oncogene* 12, 1361-1364.
- Kelly, T. J., and Brown, G. W. (2000). Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem* 69, 829-880.
- Khodjakov, A., and Rieder, C. L. (1999). The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J Cell Biol* 146, 585-596.
- Klein, E. A., Yang, C., Kazanietz, M. G., and Assoian, R. K. (2007). NFkappaB-

independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle* 6, 1115-1121.

Kochanski, R. S., and Borisy, G. G. (1990). Mode of centriole duplication and distribution. *J Cell Biol* 110, 1599-1605.

Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P. M., Watanabe, N., Hoog, C., Hie-ter, P., and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1, 371-380.

Krek, W., Ewen, M. E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W. G., and Livingston, D. M. (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78, 161-172.

Kuninaka, S., Iida, S.-I., Hara, T., Nomura, M., Naoe, H., Morisaki, T., Nitta, M., Ari-
ma, Y., Mimori, T., Yonehara, S., and Saya, H. (2007). Serine protease Omi/HtrA2
targets WARTS kinase to control cell proliferation. *Oncogene* 26, 2395-2406.

Lacey, K. R., Jackson, P. K., and Stearns, T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2817-2822.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lakin, N. D., Hann, B. C., and Jackson, S. P. (1999). The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 18, 3989-3995.

Lama, J., Guinea, R., Martinez-Abarca, F., and Carrasco, L. (1992). Cloning and inducible synthesis of poliovirus nonstructural proteins. *Gene* 117, 185-192.

Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., and Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271, 20608-20616.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

Liang, C.-C., Park, A. Y., and Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *UNKNOWN* 2, 329-333.

Lipinska, B., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* 16, 10053-10067.

Liu, J. J., Chao, J. R., Jiang, M. C., Ng, S. Y., Yen, J. J., and Yang-Yen, H. F. (1995). Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Molecular and Cellular Biology* 15, 3654-3663.

Loeb, L. A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 3075-3079.

Lowe, M., Rabouille, C., Nakamura, N., Watson, R., Jackman, M., Jämsä, E., Rahman, D., Pappin, D. J., and Warren, G. (1998). Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* 94, 783-793.

Ma, T., Van Tine, B. A., Wei, Y., Garrett, M. D., Nelson, D., Adams, P. D., Wang, J., Qin, J., Chow, L. T., and Harper, J. W. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes & Development* 14, 2298-2313.

Marampon, F., Casimiro, M. C., Fu, M., Powell, M. J., Popov, V. M., Lindsay, J., Zani, B. M., Ciccarelli, C., Watanabe, G., Lee, R. J., and Pestell, R. G. (2008). Nerve Growth factor regulation of cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS extracellular signal-regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and nuclear factor-kappaB. *Mol Biol Cell* 19, 2566-2578.

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336-1338.

Martins, L. M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N. F., Lemoine, N. R., Savopoulos, J., Gray, C. W., Creasy, C. L., Dingwall, C., and Downward, J. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277, 439-444.

Martins, L. M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G. P., *et al.* (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9848-9862.

Martz, E., and Steinberg, M. S. (1972). The role of cell-cell contact in "contact" inhibition of cell division: a review and new evidence. *J Cell Physiol* 79, 189-210.

Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893-1897.

Medema, R. H., and Bos, J. L. (1993). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 4, 615-661.

Melcher, R., Steinlein, C., Feichtinger, W., Müller, C. R., Menzel, T., Lührs, H., Scheppach, W., and Schmid, M. (2000). Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 88, 145-152.

Meltzer, M., Hasenbein, S., Hauske, P., Kucz, N., Merdanovic, M., Grau, S., Beil, A., Jones, D., Krojer, T., Clausen, T., *et al.* (2008). Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control. *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 1332-1334.

- Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* *21*, 483-492.
- Moritz, M., Braunfeld, M. B., Fung, J. C., Sedat, J. W., Alberts, B. M., and Agard, D. A. (1995a). Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* *130*, 1149-1159.
- Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Alberts, B., and Agard, D. A. (1995b). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* *378*, 638-640.
- Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R., and Dobbie, Z. (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* *32*, 1372-1374, 1376, 1378-1379.
- Murphy, S. M., Preble, A. M., Patel, U. K., O'Connell, K. L., Dias, D. P., Moritz, M., Agard, D., Stults, J. T., and Stearns, T. (2001). GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell* *12*, 3340-3352.
- Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* *6*, 369-381.
- Nayak, B. K., and Das, G. M. (2002). Stabilization of p53 and transactivation of its target genes in response to replication blockade. *Oncogene* *21*, 7226-7229.
- Nelson, P. J., and Daniel, T. O. (2002). Emerging targets: molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control. *Kidney Int* *61*, S99-105.
- Nguyen, H. G., Makitalo, M., Yang, D., Chinnappan, D., St Hilaire, C., and Ravid, K. (2009). Deregulated Aurora-B induced tetraploidy promotes tumorigenesis. *FASEB J* *23*, 2741-2748.
- Nie, G.-Y., Hampton, A., Li, Y., Findlay, J. K., and Salamonsen, L. A. (2003). Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochem J* *371*, 39.
- Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* *2*, 815-825.
- Noguchi, T., Arai, R., Motegi, F., Nakano, K., and Mabuchi, I. (2001). Contractile ring formation in *Xenopus* egg and fission yeast. *Cell Struct Funct* *26*, 545-554.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23-28.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* *100*, 71-78.
- Ohtsubo, M., and Roberts, J. M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mam-

malian fibroblasts. *Science* 259, 1908-1912.

Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2612-2624.

Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., *et al.* (2004). HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development* 131, 1041-1053.

Olaharski, A. J., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsebatt, M. E., Guzman, P., Mohar, A., and Eastmond, D. A. (2006). Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 337-343.

Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H., and Bornens, M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol* 108, 107-128.

Pallen, M. J., and Wren, B. W. (1997). The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26, 209-221.

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, e36.

Piel, M., and Bornens, M. (2001). Centrosome reproduction in vitro: mammalian centrosomes in *Xenopus* lysates. *Methods Cell Biol* 67, 289-304.

Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U., and Bornens, M. (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* 291, 1550-1553.

Pines, J. (1997). Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochim Biophys Acta* 1332, M39-42.

Pines, J., and Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* 13, 3772-3781.

Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R. J., McDonald, N., *et al.* (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 9, 1243-1252.

Reed, S. I., Bailly, E., Dulic, V., Hengst, L., Resnitzky, D., and Slingerland, J. (1994). G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl* 18, 69-73.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Molecular and Cellular Biology* 14, 1669-1679.

Resnitzky, D., Hengst, L., and Reed, S. I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by

p27Kip1. *Molecular and Cellular Biology* 15, 4347-4352.

Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13, 332-337.

Sadhu, K., Reed, S. I., Richardson, H., and Russell, P. (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5139-5143.

Sankaran, S., and Parvin, J. D. (2006). Centrosome function in normal and tumor cells. *J Cell Biochem* 99, 1240-1250.

Schliwa, M., Euteneuer, U., Gräf, R., and Ueda, M. (1999). Centrosomes, microtubules and cell migration. *Biochem Soc Symp* 65, 223-231.

Schmid, C., Schläpfer, I., Waldvogel, M., Meier, P. J., Schwander, J., Böni-Schnetzler, M., Zapf, J., and Froesch, E. R. (1992). Differential regulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 mRNA in liver and bone cells by insulin and retinoic acid in vitro. *FEBS Lett* 303, 205-209.

Serrano, M. (1997). The tumor suppressor protein p16INK4a. *Experimental Cell Research* 237, 7-13.

Shackney, S. E., Berg, G., Simon, S. R., Cohen, J., Amina, S., Pommersheim, W., Yakulis, R., Wang, S., Uhl, M., and Smith, C. A. (1995a). Origins and clinical implications of aneuploidy in early bladder cancer. *Cytometry* 22, 307-316.

Shackney, S. E., Singh, S. G., Yakulis, R., Smith, C. A., Pollice, A. A., Petruolo, S., Waggoner, A., and Hartsock, R. J. (1995b). Aneuploidy in breast cancer: a fluorescence in situ hybridization study. *Cytometry* 22, 282-291.

Shackney, S. E., Smith, C. A., Miller, B. W., Burholt, D. R., Murtha, K., Giles, H. R., Ketterer, D. M., and Pollice, A. A. (1989). Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res* 49, 3344-3354.

Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.

Shay, J. W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.

Shekhar, M. P. V., Lyakhovich, A., Visscher, D. W., Heng, H., and Kondrat, N. (2002). Rad6 overexpression induces multinucleation, centrosome amplification, abnormal mitosis, aneuploidy, and transformation. *Cancer Res* 62, 2115-2124.

Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.

Shridhar, V., Sen, A., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Kovats, S., Lee, J., Lillie, J., and Smith, D. I. (2002). Identification of underexpressed genes in early- and late-stage

primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization. *Cancer Res* *62*, 262-270.

Shteinberg, M., Protopopov, Y., Listovsky, T., Brandeis, M., and Hershko, A. (1999). Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/cdc20. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *260*, 193-198.

Simon, P. (2003). Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* *19*, 1439-1440.

Singh, R. K., Gutman, M., Reich, R., and Bar-Eli, M. (1995). Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8. *Cancer Res* *55*, 3669-3674.

Soussi, T., and Bérout, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* *1*, 233-240.

Spieß, C., Beil, A., and Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* *97*, 339-347.

Stoler, D. L., Chen, N., Basik, M., Kahlenberg, M. S., Rodriguez-Bigas, M. A., Petrelli, N. J., and Anderson, G. R. (1999). The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 15121-15126.

Storchova, Z., and Kuffer, C. (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci* *121*, 3859-3866.

Storchová, Z., Breneman, A., Cande, J., Dunn, J., Burbank, K., O'Toole, E., and Pellman, D. (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* *443*, 541-547.

Strauch, K. L., and Beckwith, J. (1988). An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* *85*, 1576-1580.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* *8*, 613-621.

Taylor, W. R., and Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* *20*, 1803-1815.

Tocharus, J., Tsuchiya, A., Kajikawa, M., Ueta, Y., Oka, C., and Kawaichi, M. (2004). Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling. *Dev Growth Differ* *46*, 257-274.

Toualbi-Abed, K., Daniel, F., Güller, M. C., Legrand, A., Mauriz, J.-L., Mauviel, A., and Bernuau, D. (2008). Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis* *29*, 536-543.

Uetake, Y., and Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J Cell Biol* *165*,

609-615.

van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* *9*, 20-26.

Vande Walle, L., Lamkanfi, M., and Vandenabeele, P. (2008). The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ* *15*, 453-460.

Varner, J. A., and Cheresch, D. A. (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* *8*, 724-730.

Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., *et al.* (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* *277*, 445-454.

Wahl, G. M., and Carr, A. M. (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* *3*, E277-286.

Wang, D., Liu, Z., Li, Q., Karpurapu, M., Kundumani-Sridharan, V., Cao, H., Dronadula, N., Rizvi, F., Bajpai, A. K., Zhang, C., *et al.* (2007). An essential role for gp130 in neointima formation following arterial injury. *Circ Res* *100*, 807-816.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* *81*, 323-330.

Wilken, C., Kitzing, K., Kurzbauer, R., Ehrmann, M., and Clausen, T. (2004). Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell* *117*, 483-494.

Wong, C., and Stearns, T. (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol* *6*, 6.

Woodford-Richens, K. L., Rowan, A. J., Gorman, P., Halford, S., Bicknell, D. C., Wasan, H. S., Roylance, R. R., Bodmer, W. F., and Tomlinson, I. P. (2001). SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* *98*, 9719-9723.

Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., and Shay, J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* *9*, 3088-3092.

Wu, C. H., Pan, J. S., Chang, W. C., Hung, J. S., and Mao, S. J. T. (2005). The molecular mechanism of actinomycin D in preventing neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *J Biomed Sci* *12*, 503-512.

Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ishikawa, R., and Matsumura, F. (1990). Mitosis-

specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature* *344*, 675-678.

Yang, C., Klein, E. A., Assoian, R. K., and Kazanietz, M. G. (2008). Heregulin beta1 promotes breast cancer cell proliferation through Rac/ERK-dependent induction of cyclin D1 and p21Cip1. *Biochem J* *410*, 167-175.

Yang, J., Bardes, E. S., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A., and Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes & Development* *12*, 2131-2143.

Yang, Q.-H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. L., and Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & Development* *17*, 1487-1496.

Zhang, H., Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes & Development* *8*, 1750-1758.

Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* *92*, 725-734.

Zhao, J., Kennedy, B. K., Lawrence, B. D., Barbie, D. A., Matera, A. G., Fletcher, J. A., and Harlow, E. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes & Development* *14*, 2283-2297.

Zumbrunn, J., and Trueb, B. (1996). Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Letters* *398*, 187-192.

Zurawa-Janicka, D., Kobiela, J., Stefaniak, T., Wozniak, A., Narkiewicz, J., Wozniak, M., Limon, J., and Lipinska, B. (2008). Changes in expression of serine proteases HtrA1 and HtrA2 during estrogen-induced oxidative stress and nephrocarcinogenesis in male Syrian hamster. *Acta Biochim Pol* *55*, 9-19.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Titel der Dissertation*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Nina Schmidt* befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner andern Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nina Schmidt geb. Hamelmann
Geburtsdatum/-ort	08.06.1981 in Castrop-Rauxel – NRW
Familienstand	verheiratet

Studium

08/2005 bis heute	Anfertigung der Promotion in der Abteilung Mikrobiologie II an der Universität Duisburg-Essen zum Thema „ Die Serin-Protease HtrA1 ist ein neuer Regulator der Zellteilung und spielt eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation“
08/2004 bis 01/2005	Diplomarbeit am Zentrum für Klinische Forschung der Ruhr- Universität Bochum, Abteilung für Molekulare Gastroenterologische Onkologie zum Thema „Validierung und funktionelle Charakterisierung des DPC4/ Smad4 - Zielgens PSCA“
10/2000 bis 03/2005	Diplom-Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum, Schwerpunkt Molekulare Medizin

Schule

06/2000	Abitur am Ernst-Barlach-Gymnasium Castrop-Rauxel
---------	--