

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München

(Direktor: Prof. Dr. Burkhard Göke)

**MECHANISMUS DER APOPTOSE-SENSITIVIERUNG
DURCH DEN TUMORSUPPRESSORGEN-KANDIDATEN DRO 1**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Claudia Barbara Wypior
aus
Regensburg

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Kolligs

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Fiegl

Prof. Dr. Andreas Jung

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Andreas Herbst

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.7.2012

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I) EINLEITUNG	6
1. Das kolorektale Karzinom.....	6
1.1. Ätiologie.....	6
1.2. Klassifizierung, Klinik und Therapie.....	6
1.3. Molekulare Grundlagen.....	9
2. Grundlagen der Karzinogenese.....	12
3. Apoptose.....	15
3.1. Der Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg.....	18
3.2. Der intrinsische Apoptoseweg.....	19
3.3. ER-Stress vermittelte Apoptose.....	20
3.4. Apoptoseresistenzmechanismen.....	20
4. DRO1 – Stand der Forschung.....	23
5. Fragestellung.....	27
II) MATERIAL UND METHODEN	29
1. Reagenzien.....	29
1.1. Zellkultur.....	29
1.2. Apoptoseassays.....	29
1.3. Western Blot.....	31
2. Methoden.....	34
2.1. Zellkultur.....	34
2.2. Apoptoseassays.....	36
2.2.1. Messung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie.....	37

2.2.2. Hoechst-Staining 33342	38
2.3. Western Blot und Immundetektion	39
2.3.1. Herstellung der Zelllysate.....	39
2.3.2. Proteinbestimmung.....	40
2.3.3. Vorbereitung der Proben für die Protein-Gelelektrophorese.....	41
2.3.4. Gelelektrophorese.....	41
2.3.5. Western Blot.....	42
2.3.6. Immundetektion.....	42
2.3.7. Färbemethoden	43
III) ERGEBNISSE.....	45
1. Generierung monoklonaler kolorektaler Karzinomzelllinien, die induzierbar DRO1 exprimieren.....	45
2. DRO1 reguliert Apoptose über den extrinsischen Apoptoseweg.....	47
3. DRO1 hat keinen Effekt auf den intrinsischen Apoptoseweg.....	57
4. DRO1 hat keinen Effekt auf den ER-Stress-vermittelten Apoptoseweg.....	58
IV) DISKUSSION.....	60
V) ZUSAMMENFASSUNG.....	69
VI) ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	70
VII) LITERATURVERZEICHNIS	71
VIII)DANKSAGUNG.....	77

I) EINLEITUNG

1. Das kolorektale Karzinom

1.1. Ätiologie

Das kolorektale Karzinom ist nach dem Bronchialkarzinom das zweithäufigste Karzinom des Mannes und nach dem Mammakarzinom das zweithäufigste Karzinom der Frau und gehört somit zu den häufigsten malignen Erkrankungen in Deutschland und der gesamten westlichen Welt [1-2]. Im Laufe des Lebens erkrankt durchschnittlich jeder 18.-20. Deutsche an einem kolorektalen Karzinom, wobei sich die Inzidenz ab dem 40. Lebensjahr alle 10 Jahre verdoppelt [1,3]. In der Normalbevölkerung liegt das Lebenszeiterkrankungsrisiko damit bei etwa 6% [2]. In den Entwicklungsländern tritt das kolorektale Karzinom dagegen sehr selten auf, was auf eine ätiologische Bedeutung von zivilisationsabhängigen Umweltfaktoren hinweist [1].

Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist bei Risikogruppen das Erkrankungsrisiko hingegen deutlich erhöht [3]. Zu den prädisponierenden Faktoren gehören neben Alter und positiver Familienanamnese unter anderem Umweltfaktoren, wie fleisch- und fettreiche sowie ballaststoffarme Ernährung. Desweiteren ist das Erkrankungsrisiko beim Vorliegen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, beispielsweise bei Colitis ulcerosa, und Vorläuferläsionen, wie kolorektalen Adenomen erhöht. Bei der Mehrzahl (ca. 90%) der kolorektalen Karzinome handelt es sich um „spontane“ Karzinome. Dem gegenüber sind etwa 10% der Fälle auf genetische Disposition zurückzuführen. Dabei sind die obligate Präkanzerose FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) (1%) und das autosomal-dominant vererbte sog. Lynch-Syndrom (hereditäres non-polypoides Kolonkarzinom / HNPCC) (5%) besonders zu erwähnen. [3]

In Deutschland versterben derzeit etwa 30.000 Menschen pro Jahr an den Folgen des kolorektalen Karzinoms.

1.2. Klassifizierung, Klinik und Therapie

Die Einteilung der kolorektalen Karzinome kann nach der TNM-, der UICC- oder der DUKES-Klassifikation erfolgen und richtet sich nach dem Ausmaß der Tumordinfiltration, nach Lymphknoten- und Fernmetastasierung [1, 3].

60% der kolorektalen Karzinome sind im Rektum lokalisiert, 20% im Sigma und je 10% in Zökum und Kolon ascendens. Die verbleibenden 10% sind über das übrige Kolon verteilt [1, 3].

Histologisch handelt es sich bei 95% der Karzinome um Adenokarzinome, die sich in den meisten Fällen aus primär benignen Adenomen entwickeln [1]. Nach dem Differenzierungsgrad kann zwischen *low grade*- (G1 und G2, gut bis mäßig differenzierten) und *high grade*- (G3 und G4, schlecht differenzierten bzw. undifferenzierten) Karzinomen unterschieden werden [3]. Die übrigen 5% sind Plattenepithelkarzinome, Siegelringzellkarzinome, kleinzellige, adenosquamöse, medulläre oder undifferenzierte Karzinome. Sehr selten treten auch Lymphome und Karzinoide auf [1-2].

Durch kontinuierliches Wachstum breitet sich der Tumor lokal aus. Die Metastasierung erfolgt hämatogen primär in die Leber, sekundär in die Lunge oder lymphogen in Abhängigkeit vom Sitz des Primärtumors über verschiedene Metastasenwege [1].

Klinisch verhält sich das kolorektale Karzinom zunächst eher unspezifisch, in der Regel treten keine zuverlässigen Frühsymptome auf. Die Patienten klagen über Müdigkeit und Leistungsminderung, eventuell treten Gewichtsverlust und Fieber auf. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu Änderungen der Stuhlgewohnheiten, wie Obstipation oder auch paradoxen Diarrhoen, sowie Hämatochezie, v.a. bei Rektumbefall, was häufig als Hämorrhoidalleiden fehlgedeutet wird. Spätsymptome sind Ileuserscheinungen, chronische Anämien als Folge von Blutungen und Schmerzen [3].

Da sich die Karzinome im Großteil der Fälle aus benignen Vorstufen entwickeln, werden auch bei Patienten ohne erhöhtes Risikoprofil präventive Vorsorgeuntersuchungen wie fäkale Okkultblut-Tests (Hämokkult-Test) ab dem 50. Lebensjahr und Koloskopien ab dem 55. Lebensjahr empfohlen [3].

Die Wahl der optimalen Therapieform bei kolorektalen Karzinomen ist abhängig von der Tumorlokalisation, der -ausbreitung und der Metastasierung [2, 4].

Bei Kolonkarzinomen ohne Fernmetastasierung in den UICC-Stadien I-III wird nach kurativem Therapieansatz nach Möglichkeit primär eine R0-Resektion mit radikaler Lymphadenektomie und Entfernung des Mesenteriums vorgenommen. Eine adjuvante Chemotherapie ist bei Karzinomen im Stadium UICC I nicht indiziert, kann im Stadium

UICC II erwogen werden und ist im Stadium III oder im Stadium II bei Auftreten von Risikofaktoren, wie beispielsweise einer Tumorperforation, Standard. Bei Fernmetastasierung (UICC IV) muss individuell über das weitere Procedere entschieden werden. Liegen einzelne resektable Metastasen vor, können diese gegebenenfalls zusammen mit dem Primärtumor operativ entfernt werden. Handelt es sich um ein fortgeschrittenes Tumorstadium sollte eine palliative systemische Chemotherapie durchgeführt werden, um eine Regression des Tumors und der Metastasen zu erreichen und so Symptome lindern zu können bzw. Komplikationen zu verhindern [2-4].

Das Rektumkarzinom wird im UICC-Stadium I ebenfalls mit einer radikalen Entfernung des Tumors einschließlich der Lymphknoten und des Mesorektums kurativ therapiert, es besteht keine Indikation zur weiteren adjuvanten Therapie.

In den UICC-Stadien II und III bzw. bei tief sitzenden Tumoren ist eine neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie Standard. Dabei sollte die Strahlentherapie simultan mit einer 5-Fluorouracil-basierten Chemotherapie zur Anwendung kommen [4]. Unabhängig vom postoperativen Tumorstadium besteht nach neoadjuvanter Therapie beim Rektumkarzinom die Indikation zu einer adjuvanten Chemotherapie [4].

Bei systemischer Metastasierung (UICC-Stadium IV) muss individuell eine Therapieform gefunden werden. Irresektable Metastasen sollten zunächst mit einer palliativen systemischen Chemotherapie behandelt werden, eventuell kann hier ein „Down-Staging“ der Metastasen und des Primärtumors und damit eine mögliche sekundäre Resektabilität erreicht werden [4].

Das Therapieregime richtet sich nach dem primären Therapieziel. In der Erstlinientherapie kann das kolorektale Karzinom zum einen mittels Monotherapie mit dem Fluoropyrimidin 5-Fluorouracil (5-FU) mit oder ohne Folinsäure, zum anderen mit einer Kombinationstherapie aus verschiedenen Chemotherapeutika behandelt werden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass durch die Kombination der einzelnen Substanzen die Ansprechraten und das progressionsfreie Überleben gegenüber der 5-FU-Monotherapie deutlich verbessert wurden. Dabei kann 5-FU/Folinsäure sowohl mit Oxaliplatin (FOLFOX), als auch mit Irinotecan (FOLFIRI) kombiniert werden. Beide Protokolle zeigten sich in Studien in ihrer Wirksamkeit etwa gleichwertig. Durch die Zugabe der monoklonalen Antikörper Bevacizumab oder Cetuximab, dabei handelt es sich um monoklonale Antikörper gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*), können Ansprechrate und Überleben weiter verbessert werden. Durch die neueren Chemotherapeutika und Therapieprotokolle konnten das

Gesamtüberleben und die Tumorkontrolle insgesamt deutlich von 6 - 12 Monaten auf über 24 Monate verbessert werden [4].

In der Zweit- und Drittlinientherapie spielen die vorangegangene Therapie, das therapiefreie Intervall, der Allgemeinzustand des Patienten und das Therapieziel eine wichtige Rolle. Die Therapie sollte bis zum Progress der Erkrankung durchgeführt werden.

Möglich sind die Kombinationen von Irinotecan oder Oxaliplatin mit Fluoropyrimidinen oder Irinotecan mit Cetuximab. Desweiteren kann in der Zweit- und Drittlinientherapie auch Bevacizumab in Kombination mit Oxaliplatin, 5-FU und Folsäure gegeben werden. Bei Unverträglichkeit von irinotecanhaltigen Chemotherapien oder Nichtansprechen von Oxaliplatin werden biologische Substanzen wie Cetuximab oder auch Panitumumab, der erste vollständig humane monoklonale Antikörper, in der Drittlinientherapie erfolgreich auch als Monotherapien eingesetzt [2, 4].

1.3. Molekulare Grundlagen

Kolorektale Karzinome entwickeln sich in einem langjährigen Prozess aus intraepithelialen Neoplasien. Vogelstein beschrieb dies in der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz, bei der es durch die Kumulation genetischer Veränderungen zu maligner Transformation und damit zu dysplastischem und schließlich neoplastischem Wachstum kommen kann [3, 5]. Die Tumorprogression bis zum Karzinom dauert dabei in etwa 10 Jahre. Entscheidend für die Tumorgenese ist die Aktivierung bzw. Mutation von Tumoronkogenen, wie beispielsweise K-ras oder c-myc, sowie eine Suppression oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie APC (*Adenomatous polyposis coli*), DCC (*deleted in colorectal cancer*) und p53 [5].

Am Beginn der kolorektalen Karzinogenese steht zunächst meist eine inaktivierende Mutation oder der Verlust des APC-Gens durch einen Allelverlust (*loss of heterozygosity*/LOH [6-7]) auf Chromosom 5. Dies ist bei 50-70% aller Adenome im Frühstadium nachweisbar, sowohl bei den sporadischen, als auch bei den vererbten Formen wie FAP [2, 8-10]. Defekte von APC, einem wichtigen negativen Regulator des Wnt/ β -Catenin/TCF-Signalweges, spielen in der kolorektalen Karzinogenese eine bedeutende Rolle [11-13]. Durch Veränderungen bzw. Inaktivierung von APC wird das Protoonkogen β -Catenin stabilisiert, das sich so in Zytoplasma und Zellkern anreichert und dort mit Kofaktoren der Tcf/LEF-Transkriptionsfaktor-Familie (TCF1, TCF3, TCF4)

interagieren kann. Dadurch wird die Transkription verschiedener Gene mit onkogener Wirkung, wie beispielsweise das Protoonkogen *c-myc*, beeinflusst oder Zellzyklusregulatoren, z.B. Cycline, aktiviert. [10-11, 13-14]

Durch den Verlust von APC und die daraus resultierende Aktivierung des Wnt-Signalweges wird die Zellproliferation angeregt und die Zellzyklusregulation verändert. Im Verlauf der Tumorentstehung werden dann weitere Onkogene, wie z.B. K-ras aktiviert. Zudem kommt es an weiteren Stellen zu LOH (*loss of heterozygosity*), am Chromosom 17p beispielsweise führt dies zur Inaktivierung und damit zum Verlust des Tumorsuppressors p53. In 70% der Fälle ist beim kolorektalen Karzinom auch ein Allelverlust in der Chromosomenregion 18q21 nachweisbar, wodurch es zur Inaktivierung von DCC und weiteren potenziellen Tumorsuppressorgenkandidaten wie SMAD4 oder ITF2B kommt. [15-17]. Malignes Wachstum entwickelt sich somit über viele Schritte und resultiert aus der Akkumulation verschiedener genetischer Mutationen.

Damit in einer Zelle eine solche Akkumulation genetischer Veränderungen entstehen kann, muss eine sogenannte genetische Instabilität vorliegen. Diese führt dazu, dass es zum Verlust von Mechanismen, die auf die Zellproliferation und Apoptoseregulation Einfluss nehmen, kommt [5]. Ursächlich für eine genetische Instabilität kann zum einen das Phänomen der chromosomalen Instabilität (CIN), zum anderen die sog. Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), bedingt durch einen Defekt im DNA-Reparatursystem (*mutation mismatch repair/MMR*), sein [5, 8].

Die chromosomale Instabilität (CIN), die bei etwa 80% der kolorektalen Karzinome auftritt, entwickelt sich durch Chromosomensegregationsstörungen während der Mitose, was zum Verlust ganzer Chromosomen oder Teilen davon führt. Ein aneuploider Chromosomensatz bei Tumoren mit CIN ist dabei die Folge [8, 18].

Die Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) spielt bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen in etwa 20% der sporadischen und besonders bei hereditären Formen, wie dem hereditären non-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC), eine Rolle [5, 19], tritt damit aber insgesamt nicht so häufig auf wie die chromosomale Instabilität. Bei Verlust oder Defekt des DNA-Reparatursystems *mutation mismatch repair system (MMR)*, einer Gruppe von Proteinen, die in gesundem Gewebe Replikationsfehler erkennen und deren Reparatur induzieren, häufen sich Replikationsfehler und Mutationen vorwiegend im Bereich von sog. Mikrosatelliten. Dabei handelt es sich um kurze, repetitive, nicht-kodierende DNA-Sequenzen. [5, 20]. Während die Mikrosatelliten-Instabilität bei

hereditären Tumoren durch Keimbahnmutationen von DNA-Reparaturgenen, wie beispielsweise *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, entsteht, kommt sie bei sporadischen Formen vorwiegend durch eine Hypermethylierung des Promotors von *hMLH1* zustande [5, 19, 21]. Dadurch wird die Transkription des jeweiligen Gens verhindert.

Der Defekt des MMR verursacht Mutationen in den Genen, die für die Mikrosatelliten-Repeats kodieren, und begünstigt dadurch die Entstehung von Tumoren [5]. Anhand der Ausprägung der Instabilität lassen sich Tumore mit MSI weiter in MSI-high, MSI-low und MSI-stabil unterteilen. Mithilfe dieser Differenzierung können Aussagen zur Prognose der Erkrankung getroffen werden [22].

Die Folge des defekten *mismatch repair* sind Leserasterverschiebungen und Mutationen in Wachstums- und Apoptoseregulierenden Genen (TGF β IIIR, Bax). Zudem aktivieren MSI-Tumoren im Verlauf der Tumorgenese durch Stabilisierung von β -Catenin den Wnt-Signalweg [2]. Tumoren mit MSI weisen, im Gegensatz zu Tumoren mit CIN, einen diploiden Chromosomensatz auf [5, 18].

Neben der Unterscheidung zwischen MSI und CIN findet man bei den kolorektalen Karzinomen eine Untergruppe, die sich durch eine übermäßige Hypermethylierung von CpG-Inseln auszeichnet, der sog. „CpG island methylator phenotype“ (CIMP) [9, 21]. CIMP tritt in etwa 30% der kolorektalen Karzinome auf [23]. Durch die Hypermethylierung der DNA an CpG-Inseln, 500-2000 Basenpaare langen, CpG-Dinukleotid-reichen Regionen, die vorwiegend in den Promotorregionen von Genen lokalisiert sind [20-21], kommt es in CIMP-Tumoren zum sogenannten *transcriptional silencing*, was zur Inaktivierung verschiedener Gene, u.a. von Tumorsuppressorgenen und Zellzyklusregulatoren, wie p16, führt [21, 23]. Auch die CIMP-Tumore können nach der Ausprägung weiter in Subtypen eingeteilt werden: CIMP-high, CIMP-low und CIMP-negativ [22].

Des Weiteren liegt eine Verbindung von Tumoren mit CIMP (CIMP+) mit sporadisch auftretenden MSI-Tumoren vor, während das Lynch-Syndrom CIMP-negativ ist. Man geht davon aus, dass auch der Promotor von *hMLH1* hypermethyliert wird, wodurch sich die *MLH1*-Expression verändert und so ein Defekt des MMR entsteht [24]. Ein Großteil der Tumore mit MSI gehört der Gruppe der CIMP-positiven Tumore an, wobei die Ausprägung der Mikrosatelliten-Instabilität und das Vorliegen von CIMP mit der Morphologie des jeweiligen Tumortyps korreliert und so zwischen fünf verschiedenen Tumorgruppen (z.B. Typ 1: CIMP-high/MSI-H; Typ 3: CIMP-low/MSS oder MSL)

unterschieden werden kann [22]. Anhand dieser Einteilung können hier auch Aussagen zur Prognose des jeweiligen Tumortyps getroffen werden können [22].

2. Grundlagen der Karzinogenese

Die Genese maligner Tumore ist ein komplexer Prozess aus vielen einzelnen Schritten, zu dem vor allem unkontrolliertes Zellwachstum und Immortalität von Zellen einen entscheidend beitragen.

Auf molekularer Ebene werden zunächst Tumorsuppressorgene, wie APC und p53, inaktiviert, während Onkogene, wie Ras und c-myc, vermehrt exprimiert oder durch Mutation aktiviert werden. Im Verlauf ergeben sich darauf aufbauend Veränderungen auf Zell- und Organebene [25].

D. Hanahan [26] beschrieb grundlegende Veränderungen in einer Zelle, die malignes Wachstum begünstigen, wie die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, die Angiogenese und die Fähigkeit zur Metastasierung. Nahezu alle malignen Tumoren erlangen im Laufe der Tumorgenese diese Eigenschaften, die Reihenfolge aber, in der die Veränderungen auftreten, ist abhängig von der jeweiligen Art des Tumors (siehe Abb. 1).

Eine entscheidende Veränderung, die zur Malignität einer Zelle beiträgt, ist die **Selbstversorgung mit Wachstumssignalen**. Während intakte Zellen in Abwesenheit solcher Signale nicht proliferieren können, produzieren die Tumorzellen diese selbst und erreichen dadurch eine Unabhängigkeit von extrazellulären Signalen und ihrem Umfeld. Zudem werden an der Zelloberfläche Rezeptoren für extrazelluläre Wachstumssignale überexprimiert, woraufhin die Zelle sensibler auf diese Signale reagiert. Auch strukturelle Veränderungen der Rezeptoren können eine Unabhängigkeit von extrazellulären Signalen bewirken. Desweiteren kann die Zelle Veränderungen an den einzelnen Komponenten der Signalwege vornehmen, die hinter den Wachstumssignalrezeptoren liegen. In einem Tumor werden zudem vermehrt Wachstumssignale von Nachbarzellen abgegeben. [26]

Ein weiterer Aspekt ist die **geringer werdende Sensibilität der Tumorzellen gegenüber wachstumshemmenden Signalen**. Dies wird sowohl durch verminderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie Integrinen, die auf wachstumshemmende Signale anderer Zellen reagieren, als auch durch vermehrte Bildung von Rezeptoren für Wachstumssignale vermittelt. Durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen wird es möglich, dass inhibitorische Signale, die die Zelle eigentlich in Apoptose oder Zellzyklusarrest führen sollten, in proliferative Signale

„übersetzt“ werden [25]. Ein Beispiel dafür ist die Herabregulierung von TGF- β -Rezeptoren und die daraus resultierende vermehrte Zellproliferation [27].

Einer der wichtigsten Mechanismen bei der Entstehung einer malignen Zelle stellt die **Resistenz gegenüber Apoptose** dar. Dabei spielt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 eine besonders entscheidende Rolle. Der Verlust von p53 bewirkt, dass DNA-Schäden, Hypoxie oder andere Formen von Zellstress in der Zelle nicht mehr korrekt erkannt werden und somit kein Apoptosevorgang induziert wird [26]. Auf die genaueren Mechanismen der Apoptoseresistenz wird im Lauf des Textes noch weiter eingegangen.

Die genannten Veränderungen in der Zelle führen zu unkontrolliertem Tumorwachstum der Zelle, unabhängig von ihrem umgebenden Gewebe. Damit es zur Bildung eines makroskopischen Tumors kommen kann, entwickelt die Tumorzelle die Fähigkeit zur **unbegrenzten Replikation** [26]. In einem Großteil von Tumoren wird dies durch die Überexpression oder Reaktivierung des Enzyms Telomerase erreicht, wodurch es zur Aufrechterhaltung der Telomere der DNA bei der Replikation und damit unbegrenzte Zellteilung möglich wird [28]. Die Dysfunktion der Telomere bewirkt zudem genetische Veränderungen in tumorrelevanten Signalwegen und begünstigt so das Fortschreiten des Tumors [28].

Eine weitere wichtige Eigenschaft eines malignen Tumors ist die Induktion von **Angiogenese**. Dieser komplexe Prozess wird vom Tumorzellverband genau reguliert. Abhängig von der Art des Karzinoms werden bei einigen Tumoren Signale zur Induktion der Gefäßneubildung, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und FGF1/2 (*fibroblast growth factor*), vermehrt exprimiert, während in anderen die Expression von Angiogenese-hemmenden Substanzen, wie Thrombospondin-1 oder Interferon- β herab reguliert wird [26]. Beispielsweise Thrombospondin-1, das in gesundem Gewebe von p53 aktiviert wird, wird bei Verlust des Tumorsuppressors im Rahmen der Karzinogenese vermindert exprimiert, wodurch die Gefäßproliferation ungehemmt fortschreiten kann.

Gewebeinvasion und die Fähigkeit zur **Metastasierung** sind die letzten Schritte, die im Verlauf der Karzinogenese von Bedeutung ist. Um das umliegende Gewebe zu infiltrieren und an anderer Stelle im Körper zu metastasieren zu können, muss sich die Tumorzelle aus ihrem umgebenden Zellverband lösen. Dies wird zum einen dadurch erreicht, dass Proteine, wie die sog. CAMs (*cell-cell adhesion molecules*), Integrine und E-cadherin, die für die Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung verantwortlich sind, durch Mutationen, Deletionen oder proteolytische Spaltung inaktiviert werden [26, 29].

Zum anderen werden extrazelluläre Proteasen überexprimiert, aktiviert und an der Zelloberfläche so positioniert, dass die Invasion ins umliegende Gewebe erleichtert wird [26]. Abhängig von der Art des Tumors variieren Zeitpunkt und Weg der Metastasierung.

Die Resistenz gegenüber Apoptose und wachstumshemmenden Signalen bilden die Grundlage für die Entstehung eines Karzinoms und darauf aufbauend erlangen die Zellen die oben genannten Eigenschaften [25]. Entscheidend ist dabei das Zusammentreffen mehrerer Ereignisse.

Da Apoptose und die Mechanismen, die zur Resistenzentwicklung gegenüber Apoptose führen, für die Entstehung eines Karzinoms eine besonders große Rolle spielen, soll an dieser Stelle näher darauf eingegangen werden.



3. Apoptose

In menschlichen Zellen treten zwei Formen von Zelltod auf, **Nekrose** und **Apoptose**. Bei der Nekrose handelt es sich um einen nicht-genkontrollierten, passiven Vorgang, zu dem es vor allem im Rahmen von Gewebeschädigung und Verletzungen kommt. Die Zelle schwillt an, die Integrität der Membran geht verloren und DNA wird abgebaut [30]. Durch Freisetzung von zellulären Bestandteilen in den extrazellulären Raum kommt es zu einer Entzündungsreaktion [31].

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Apoptose, dem sog. programmierten Zelltod, um einen hochgeordneten, genetisch kontrollierten Prozess, der sowohl physiologischer als auch pathologischer Natur sein kann. Sie ist gekennzeichnet durch Volumenverlust von Zellkern und Zelle, der eine Zellschrumpfung zur Folge hat. Bei intakter Zellmembran und -organellen kommt es zu Abschnürungen und zur Bildung apoptotischer Körperchen. Das Chromatin liegt im Zellkern in kondensierter Form vor [30]. Auf der intakten Zellmembran präsentiert sich Phosphatidylserin, das sich bei gesunden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet, nach außen und animiert damit Makrophagen und benachbarte Zellen zur Phagozytose. Da keine Bestandteile des Zellinneren in den Extrazellulärraum gelangen, kommt es bei diesem Vorgang weder zu einer Entzündungsreaktion noch zur Aktivierung des Immunsystems [32]. In gesundem Gewebe stehen Apoptose und Zellteilung im Gleichgewicht miteinander.

Apoptose kann durch verschiedene physiologische, aber auch pathologische Signale und als Reaktion auf zellulären Stress ausgelöst werden. Durch externe und interne Stimuli wird eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, bei der es durch enzymatische Proteolyse zur Aktivierung sogenannter Caspasen, intrazellulären Cystein-Proteasen, die Proteine spezifisch hinter einem Aspartylrest spalten, kommt [31]. Sie liegen in der Zelle in inaktiver Form als Procaspasen vor. Man unterscheidet zwischen **Initiatorcaspasen** (Caspase-8 und -10), deren inaktive Formen lange Prodomänen enthalten, und **Effektorcaspasen** (Caspase-3, -6 und -7), die kurze Prodomänen besitzen. Die Länge der Prodomänen spielt eine Rolle bei der Bindung an Adaptermoleküle (siehe unten) [33]. Nach der Aktivierung einer Initiatorcaspase durch limitierte Proteolyse wird eine unumkehrbare Kaskade eingeleitet, bei der es zur Spaltung weiterer Caspasen kommt und an deren Ende die Effektorcaspasen stehen. Deren Aktivierung führt letztlich zu Veränderungen in der Zelle, die den Apoptoseprozess einleiten. Dabei ist vor allem die Spaltung von „Schlüsselproteinen“ erwähnenswert. Solche Schlüsselproteine sind zytoplasmatische Proteinkinasen wie FAK, PBK oder Raf-

1, deren Inaktivierung eine Zerstörung der Zelladhäsion und Loslösen von Nachbarzellen bewirkt. Als weitere Zielproteine zu nennen sind Zytoskelettproteine, wie Actin oder Tubulin, die im inaktiven Zustand die Zellform verändern, nukleäre Proteine wie Lamine, deren Spaltung den Zerfall der Kernmatrix bewirken, DNA-Reparaturenzyme und die Endonuklease **CAD** (*Caspase-aktivierte DNase*), die durch Spaltung aktiviert wird, in den Zellkern wandert und dort DNA zerschneidet [32-34].

Neben der Caspase-abhängigen Apoptose ist auch eine Caspase-unabhängige Form bekannt, die unter anderem durch die Freisetzung von Proteinen wie **AIF** (*apoptosis-inducing factor*) aus den Mitochondrien in Gang gesetzt wird [35-36]. Auf diese Form der Apoptose soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden.

Es kann zwischen verschiedenen Apoptosewegen unterschieden werden, die letztlich alle in der oben beschriebenen Aktivierung von Effektorcaspasen und dem daraus resultierenden programmierten Zelltod enden.

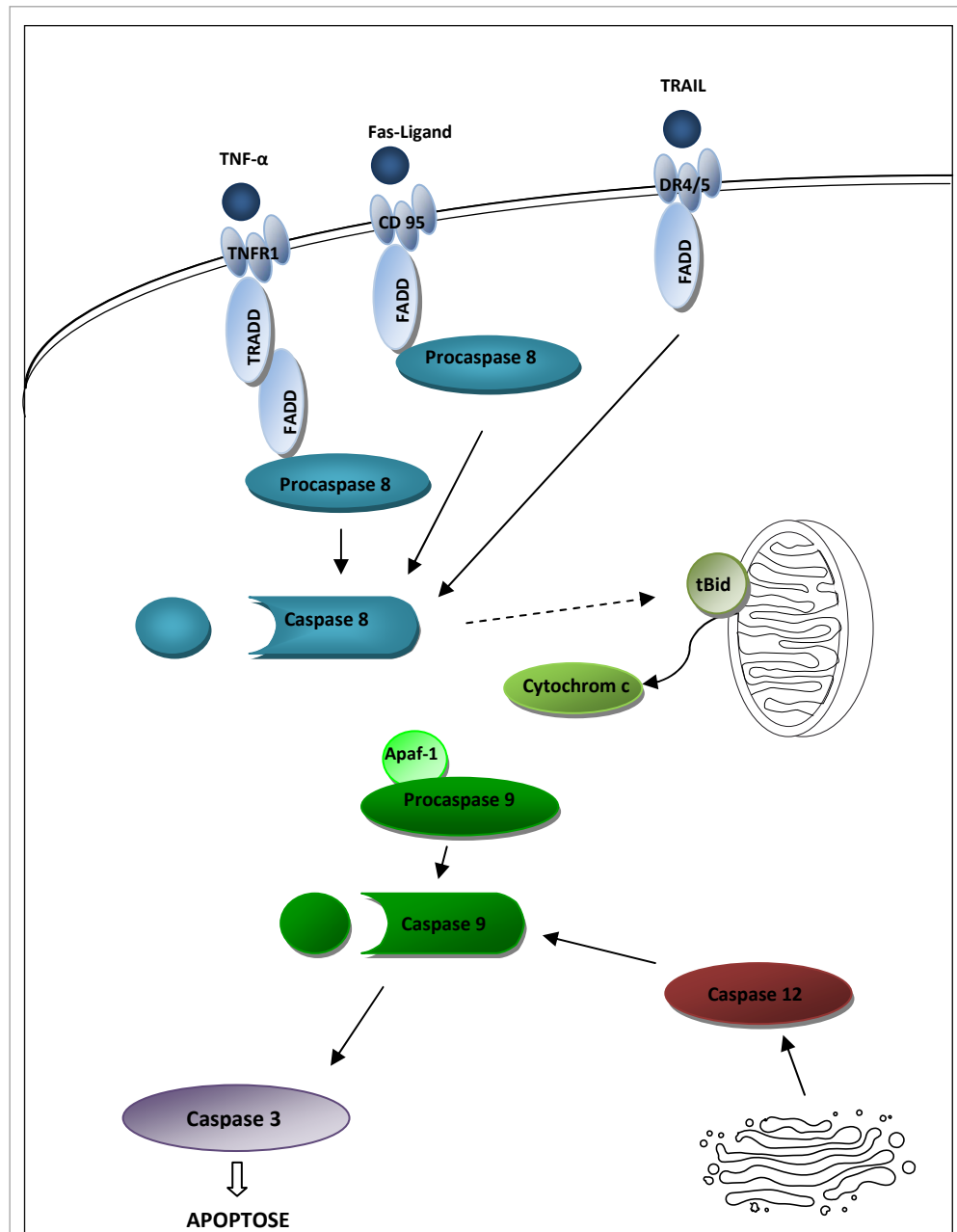


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Apoptosewege

(modifiziert nach www.cellsignaling.com [104])

Rezeptor-vermittelter Apoptoseweg → blauer Pfad

Intrinsischer Apoptoseweg → grüner Pfad

ER-Stress-vermittelter Apoptoseweg → roter Pfad

3.1. Der Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg

Die Aktivierung von Initiatorcaspasen wird beim Rezeptor-vermittelten oder extrinsischen Apoptoseweg durch extrazelluläre Faktoren induziert (Siehe Abb. 2 – blauer Pfad). Die Liganden, zu denen vor allem Cytokine wie **TNF- α** , und Oberflächenmoleküle benachbarter Zellen wie der **Fas-Ligand** gehören, binden an spezifische Transmembranrezeptoren, die sog. Todesrezeptoren [30]. Eine besonders große Rolle kommt dabei der TNF-Rezeptorfamilie zu, der der TNF- α -Rezeptor (TNFR1), der Fas-Rezeptor (synonym CD95-Rezeptor oder Apo-1-Rezeptor) und DR3 (Death Receptor 3) angehören [34, 37]. Der TNF-Rezeptor liegt als Trimer in der Plasmamembran vor und besteht aus einer membranständigen Domäne, dem eigentlichen Rezeptor, und einer zytoplasmatischen Domäne, deren Untereinheiten jeweils aus etwa 70 Aminosäuren aufgebaut sind [32]. Neben den TNF-Rezeptoren ist das TRAIL-Rezeptorsystem (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) von Bedeutung, das vorwiegend in Tumorzellen Apoptose induziert [33]. Zwei wichtige Vertreter dieser Rezeptorfamilie sind die TRAIL-Rezeptoren-1 (DR4) und -2 (DR5) [38].

Durch Bindung extrazellulärer Liganden an einen der Rezeptoren verändert sich dessen zytoplasmatische Domäne, die sog. Todesdomäne (*Death Domain, DD*), wodurch es zu Konformationsänderungen am Rezeptor kommt und Wechselwirkungen über sog. Todeseffektordomänen (*Death effector domains, DED*) [37], die an den Todesdomänen liegen, weitervermittelt werden [32]. Indem sich je zwei zytoplasmatische Adaptormoleküle **FADD** (*Fas associated death domain*) und **TRADD** (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) mit einer Procaspase-8, der inaktiven Form von Caspase-8, verbinden, kann auf der Innenseite der Zellmembran ein Multienzymkomplex entstehen. FADD wandert dabei an den Fas-Rezeptor und interagiert dort über seine DED mit den DED der Todesdomäne des Rezeptors, TRADD bindet auf die gleiche Weise an den TNFR1-Rezeptor [37]. Dieser Komplex aus zytoplasmatischer Domäne des Todesrezeptors, FADD oder TRADD und Procaspase-8 ist auch unter dem Synonym **DISC** (*death inducing signalling complex*) bekannt. FADD kann zudem auch mit TRADD, das an den TNFR1-Rezeptor gebunden ist, wechselwirken. Bei Vereinigung von zwei Procaspasen-8 in einem solchen Komplex entsteht durch gegenseitige Spaltung die aktive Tetramerform der Initiatorcaspase-8 [32, 37]. Diese setzt wiederum eine Kaskade in Gang, bei der weitere nachgeschaltete Caspasen, wie Caspase-10 und Caspase-3, aktiviert werden. Die aktivierte Effektorcaspase führt dann zu den bereits beschriebenen Veränderungen in der Zelle, die die Apoptose induzieren.

In hoher intrazellulärer Konzentration kann sich Procaspase-8 auch autokatalytisch selbst aktivieren [33].

3.2. Der intrinsische Apoptoseweg

Neben dem extrinsischen Apoptoseweg kann Apoptose auch Rezeptor-unabhängig durch intrazelluläre Signale, wie genetische Schäden, Mutationen, massiven oxydativen Stress, erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration oder Mangel an Wachstums- und antiapoptotischen Faktoren, über den intrinsischen oder mitochondrialen Apoptoseweg ausgelöst werden (siehe Abb. 2- grüner Pfad) [30, 32, 37].

Eine wichtige Rolle bei der Regulation dieses Apoptoseweges spielt die **Bcl2-Proteinfamilie**, deren Unterfamilien entweder pro-apoptotische (*Bax*, *Bid*, *Puma* oder *Bad*) oder anti-apoptotische (*Bcl-xl*, *Bcl-w*, *Bcl-2*) Eigenschaften besitzen. Das Gleichgewicht der verschiedenen Unterfamilien bestimmt die Integrität der Mitochondrienmembran und reguliert so die Sensibilität und Resistenz der Zelle gegenüber apoptotischen Stimuli [30, 33].

Durch verstärkten Zellstress werden proapoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie, wie Bax, aktiviert, was zur Insertion des Proteins aus dem Zytosol in die äußere Mitochondrienmembran und zur Entstehung einer Pore führt, durch die u.a. **Cytochrom c** aus dem Mitochondrium ins Zytosol ausströmen kann [32]. Durch die Freisetzung ins Zytosol kann Cytochrom c dort an das Adapterprotein **Apaf-1** (*apoptotic protease-activating factor 1*) und an die Procaspase-9 binden und bildet so in Anwesenheit von ATP einen Multienzymkomplex, das sog. Apoptosom [31-32, 38-39]. Procaspase-9 und Apaf-1 treten dabei über ihre *CARDs* (*caspase recruitment domains*) miteinander in Verbindung. Durch proteolytische Spaltung wird die Initiatorcaspase-9 aktiviert, was die Aktivierung einer Effektorcaspasen-Kaskade zur Folge hat, an deren Ende wiederum Caspase-3 steht, die in aktivierter Form Apoptose in der Zelle induziert.

Neben Cytochrom c können weitere proapoptotisch wirksame Faktoren, wie z.B. Smac/DIABLO, aus den Mitochondrien freigesetzt werden [35].

Auch Rezeptor-vermittelte Signalwege, die durch die Stimulation eines Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Familie ausgelöst werden, können den intrinsischen Apoptoseweg aktivieren. Bei der Bindung von extrazellulären Liganden kommt es durch Caspase-8 und -10 zur Aktivierung von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl2- Familie, wodurch sich die beschriebene Kaskade parallel zum extrinsischen Weg in Gang setzt (siehe Abb. 2).

So besteht eine Verbindung zwischen extrinsischem und mitochondrialen Apoptoseweg. Damit ist der mitochondriale Apoptoseweg in die Mehrheit der apoptotischen Vorgänge in einer Zelle involviert.

3.3. ER-Stress vermittelte Apoptose

Neben den beiden aufgeführten Apoptosewegen ist ein weiterer bekannt, der über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat führt (siehe Abb.2 – roter Pfad). Über diesen Apoptoseweg ist jedoch erst wenig bekannt und die genauen Mechanismen sind weitgehend ungeklärt. Veränderungen des Kalziumgleichgewichts in der Zelle und im ER oder die Hemmung der Glykosylierung von Proteinen im ER, lösen den sog. ER-Stress aus, der schließlich zur Spaltung und damit Aktivierung von Caspase-12, die auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, führt [40-41]. Caspase-2 scheint über den Golgi-Apparat aktiviert zu werden [39].

Caspase-12, und eventuell auch Caspase-2, aktivieren Caspase-9. Am Ende der Kaskade steht erneut die Aktivierung von Caspase-3, die Veränderungen in der Zelle initiiert, die zur Apoptose führen.

In den letzten Jahren wurde ein neues, am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Gen entdeckt, ASY/Nogo-B, das Apoptose induzieren kann und im kleinzelligen Bronchialkarzinom vermindert exprimiert wird, in Tumorzellen aber bei ektopter Expression zu verstärkter Apoptose führt, weshalb vermutet wird, dass ASY/Nogo-B Einfluss auf die Entstehung von Tumoren haben könnte [42]. Überexpression von ASY/Nogo-B führt zu ER-Stress, beispielsweise durch Veränderung des Ca^{2+} -Gleichgewichts in der Zelle und induziert so die Aktivierung von Caspase-12 [43].

3.4. Apoptoresistenzmechanismen

Um das Gleichgewicht in Geweben aufrecht erhalten zu können, müssen Zellteilung und Zelluntergang genau reguliert und aufeinander abgestimmt sein. Besonders die Apoptose spielt dort als ein physiologischer Vorgang eine wichtige Rolle. Dazu muss ein ausgewogenes Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren vorliegen [44]. Durch Veränderungen in diesem System kann es zur Entstehung von malignen Tumoren kommen, wobei die Resistenz gegenüber Apoptose ein besonders wichtiges Merkmal einer Tumorzelle darstellt.

Diese Resistenz entsteht, wenn apoptotische Vorgänge in einer Zelle durch die **IAPs** (*Inhibitor of apoptosis proteins*) und anti-apoptotischen Mitglieder der **Bcl-2**-Protein-Familie inhibiert werden.

Der extrinsische Apoptoseweg wird von mehreren verschiedenen Proteinen reguliert: Das anti-apoptotisch-wirkende Protein **FLIP** (*FLICE-inhibitory protein*) bindet an die DED des Adaptormoleküls FADD, behindert damit die Rekrutierung von Procaspase-8 und bewirkt so, dass die Bildung des DISC-Komplexes ausbleibt [45-46].

Die **IAPs** sind eine Gruppe anti-apoptotisch wirkender Proteine, die vorwiegend die Aktivierung von Caspasen hemmen. Zu dieser Proteinfamilie gehören mehrere Mitglieder, wie z.B. XIAP, c-IAP1 oder c-IAP2, wobei es sich bei XIAP (*X-chromosome-linked IAP*) um den potentesten endogenen Caspase-Inhibitor handelt [44]. Die IAPs können die Aktivierung von Caspasen verhindern, indem sie durch Bindung entweder bereits aktivierte Caspasen abbauen oder sie von ihren Substraten abschirmen [35]. Die einzelnen Mitglieder der IAP-Familie unterscheiden sich neben ihrer Lokalisation v.a. in ihrer Wirkung auf die Caspasen. XIAP hemmt vorwiegend Caspase-3, -7 und -9 [44], während c-IAP2 direkt an Caspase-2 bindet [35]. Allerdings lassen sich nicht alle Caspasen durch IAPs hemmen, wie beispielsweise die Caspasen-6, -8 und -10 [44].

Einerseits regulieren IAPs ihre Aktivität selbst über Feedback-Mechanismen und können über Autoubiquitierung ihre hemmende Wirkung kontrollieren [44], andererseits kann die Bindung von IAPs an die Caspasen durch eine Reihe mitochondrialer, pro-apoptotisch wirkender Proteine, wie **Smac** (*second mitochondria derived activator of caspases*)/**DIABLO**, **Omi** oder **XAF1** (*X-linked inhibitor of apoptosis associated factor1*) negativ beeinflusst werden. **Smac/DIABLO** wird bei Veränderung der mitochondrialen Membranpermeabilität aus der Mitochondrienmembran ins Zytosol freigesetzt, konkurriert dort aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit den Caspasen um die Bindung an die IAPs und verhindert so die Hemmung von Caspase-9 [44, 46-47]. **XAF1**, ein Protein, dessen Freisetzung von Interferonen induziert wird, bindet im Zellkern v.a. an XIAP [44, 46, 48]. XAF1 wird in Tumorgewebe kaum exprimiert, was vermuten lässt, dass es sich um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte, das im Rahmen der Karzinogenese inaktiviert wird [49].

IAP-Antagonisten können außerdem die Autoubiquitierung und den proteasomalen Abbau der IAPs induzieren [44, 47, 50]. Es hat sich gezeigt, dass IAPs in vielen

Tumorgewebe in stark vermehrter Form vorliegen, während die IAP-Antagonisten eher gering exprimiert werden. Damit lässt sich die Resistenz gegenüber Apoptosesignalen in diesen Zellen erklären.

Der intrinsische oder mitochondriale Apoptoseweg wird von den pro- und anti-apoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert. In gesundem Gewebe kann p53 als Reaktion auf interne Apoptosestimuli wie DNA-Schäden oder Zellstress die Expression von pro-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Puma oder Bax fördern, wodurch die Freisetzung von Cytochrom c vermittelt wird [26, 46]. Der Funktionsverlust von p53, einem charakteristischen Ereignis in der Entstehung von Tumoren, verhindert die Induktion von Apoptose [26]. Bei Defekt oder Mangel der pro-apoptotisch wirkenden Proteine entwickelt sich so eine Resistenz gegenüber Apoptose.

Die anti-apoptotischen Bcl-2-Mitglieder (Bcl-2, Bcl-x) werden u.a. mittels Aktivierung von NF- κ B-Transkriptionsfaktoren und Akt/PkB (Proteinkinase B) reguliert [46]. Vor allem das Protein **Akt**, eine Serin-Threonin-Kinase, die in einer Vielzahl von malignen Tumorzellen aktiviert ist, spielt eine wichtige Rolle bei der Hemmung von Apoptose und der daraus resultierenden Entstehung von Apoptoseresistenz [51]. Durch die Wirkung extrazellulärer Wachstumsfaktoren, durch intrazelluläre Signale, die von Onkogenen ausgehen, oder durch den tumorbedingten Verlust von Tumorsuppressoren, kommt es zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Akt, was zu verschiedenen anti-apoptotischen Veränderungen führt [26, 51]. Akt hemmt die Rezeptor-vermittelte Apoptose durch Verminderung der Rekrutierung von Caspase-8 zum DISC und durch Verhinderung der Spaltung von Bid. In einigen Karzinomzelllinien wird ein Anstieg von FLIP beobachtet [46]. Desweiteren beeinflusst Akt den mitochondrialen Apoptoseweg durch die Inaktivierung von Caspase-9 mittels Phosphorylierung, durch die Hemmung der Cytochrom c - abhängigen Caspase-Kaskade und die Zunahme von anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie in der Zelle [52].

Zudem besitzt Akt die Fähigkeit, Einfluss auf die Mitglieder von Transkriptionsfaktor-Familien zu nehmen, wodurch die Transkription mehrerer pro-apoptotischer Proteine, wie dem Fas-Ligand oder Bim, unterdrückt wird [46, 53].

Der Verlust von Caspase-8, die verminderte Expression von TRAIL-Todesrezeptoren, vermehrte Hemmung von Caspase-3 durch IAPs, die verminderte Freisetzung von IAP-Antagonisten, wie Smac/DIABLO, aus den Mitochondrien und die verstärkte Aktivierung

des Akt/PkB-Pathways sind entscheidende Mechanismen, die in Karzinomzellen zu Defekten der Apoptosewege und damit der Entwicklung einer Apoptoseresistenz führen [46].

4. DRO1 – Stand der Forschung

In etwa 80% der Fälle spielen bei der Entstehung von kolorektalen Tumoren Veränderungen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges eine wichtige Rolle. Durch die Stabilisierung von β -Catenin wird in den Tumorzellen die Expression mehrerer Gene, vor allem von Protoonkogenen, wie MYC oder CYCD1, verstärkt. Jedoch nur einige wenige Gene sind bekannt, wie *DRCTNNB1A* [54], *MCP-3* [55] und *IGFBP-6* [56], die bei aktiviertem Wnt-/ β -Catenin-Signalweg herunter reguliert werden.

2005 wurde in transformierten RK3E-Zellen mit aktiviertem β -Catenin ein weiteres Gen entdeckt, das in Karzinomzellen vermindert exprimiert wird, das Gen **DRO1** (*down-regulated by oncogenes 1*) [11]. DRO1 wurde in allen Organen der Ratte nachgewiesen, besonders hoch war die Expression jedoch im Epithel von Darm und Pankreas und im Fettgewebe. Auch in humanem Gewebe wurde DRO1 entdeckt, das menschliche Gen und das der Ratte besitzen dabei strukturell große Ähnlichkeit. Das menschliche DRO1-Gen ist auf Chromosom 3q13.2 lokalisiert, enthält 8 Exons, besteht aus 2853 Basenpaaren [57] und kodiert für ein Protein mit einem offenen Leseraster von 949 Aminosäuren.

DRO1 enthält drei sogenannte Internal-Repeats (IR) und eine coil-coiled Region, wobei sich IR1 über die Aminosäuren (AS) 140-281, IR2 von AS 614-760 und IR3 von AS 770-913 erstreckt. Diese Repeats stellen die am stärksten konservierten Regionen dar, daher handelt es sich dabei vermutlich um funktionell wichtige Regionen [11]. Die Repeats besitzen eine große Ähnlichkeit mit den Carboxy-terminalen Regionen der Gene *DRS/SRPX/ETX1* (*down-regulated by src/Sushi-repeat protein on the X-chromosome*), das im folgenden mit *drs* bezeichnet wird [58-59], und *SRPUL* [60].

DRS wurde entdeckt als ein Gen, das in Fibroblasten in normalem Maß exprimiert wird, aber in von retroviralen Onkogenen (*v-src*, *v-ras*, *v-abl*) transformierten Zelllinien und in verschiedenen Tumorgeweben, u.a. dem Kolonkarzinom, stark supprimiert ist [59, 61-62]. Das Protein *drs* besteht aus mehreren Domänen, einer Transmembrandomäne, einer kurzen intrazellulär gelegenen C-terminalen Domäne und drei am N-terminalen Ende extrazellulär gelegenen sog. Sushi-Motive [61]. Dabei handelt es sich um stark konservierte, sich wiederholende Sequenzen, die charakteristische Disulfidbrücken

immer zwischen dem 1. und 3. und zwischen dem 2. und 4. Cystein der Aminosäuresequenz ausbilden [63]. Sie gehören der Selektinfamilie an und tragen u.a. die Funktion von Adhäsionsmolekülen und Bindungsproteinen [61]. Drs ist ein Mitglied der Sushi-Repeat-enthaltenden Proteinfamilie, die aus über 25 weiteren Mitgliedern besteht [63]. Dabei handelt es sich um Proteine unterschiedlichster Funktion, wie Proteine des Komplementsystems, der Blutgerinnung, des Sauerstofftransports und Lymphokine [63].

Drs wurde sowohl am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und als auch in der Plasmamembran nachgewiesen [64]. Es sensitiviert die Zellen für die sogenannte „detachment-induced apoptosis“, oder „Anoikis“, was bedeutet, dass es in Tumorzellen das Wachstum zu hemmt, sobald sie die Verbindung zu einer Unterlage verlieren. Durch Interaktion mit *ASY/Nogo-B/RTN-x*, einem apoptotisch wirkenden Protein, das am ER lokalisiert ist, und über Aktivierung der Caspasen-12, -9 und -3, kann das Protein Drs, unabhängig von p53 und vom mitochondrialen Apoptoseweg, Apoptose induzieren. Drs verstärkt so die Sensitivität für Apoptose und supprimiert das Tumorstwachstum [64]. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei Drs um einen potenziellen Tumorsuppressor handeln könnte [64].

Bei der genaueren Analyse der Aminosäuresequenz mit Hilfe von Gendatenbanken, lässt sich neben den Gemeinsamkeiten zu *drs* eine Homologie zu weiteren Genen erkennen [11]. Es spricht vieles dafür, dass es sich hierbei um eine gemeinsame Genfamilie handeln könnte. Bei einem der Gene handelt es sich um das Gen *Equarin* des Huhns.

Equarin wurde in den Zellen des Auges von Hühnern entdeckt [65]. Es sind zwei Splicevarianten bekannt, eine längere Version mit einem offenen Leseraster von 958 Aminosäuren, *Equarin-L*, und eine kürzere, mit einem offenen Leseraster von 601 Aminosäuren, *Equarin-S* [65]. Die Aminosäuresequenz des Proteins *Equarin-L* besitzt eine große Ähnlichkeit mit der von DRO1. Desweiteren enthält das Protein *Equarin-L* drei übereinstimmende Repeat-Regionen, die der 5. Domäne des SRPX zu 30% gleichen [65]. *Equarin* scheint sezerniert zu werden, da es sowohl im Zellinneren als auch im Überstand nachweisbar ist, wobei die Sekretion vermutlich aufgrund posttranslationaler Prozesse, wie Glykosylierung erfolgt. Die genauen Mechanismen sind jedoch nicht bekannt. Das Gen wird in der Linse nicht in gleichförmiger Weise exprimiert, sondern unterliegt einer dorso-ventralen Polarität. Während *Equarin* eine wichtige Rolle in der

Embryogenese des Auges spielen könnte, da es vorwiegend in der embryonalen und nur einer sehr kurzen postnatalen Phase der Entwicklung der Linse nachzuweisen ist, scheint es auf die Zellproliferation hingegen keinen Einfluss zu haben [65].

Das Gen *Urb* (*up-regulated in bombesin receptor subtype (BRS) 3 deficient mice*) der Maus weist eine hohe Homologie zum humanen DRO1 auf. Ebenso kodiert es ein Protein mit 949 Aminosäuren, das ein Molekulargewicht von 108kDa aufweisen müsste [66-67]. Das tatsächliche Molekulargewicht beträgt allerdings etwa 150kDa, da es sich um ein Glykoprotein mit einem Signalpeptid am N-terminalen Ende handelt, das sezerniert wird [66-68]. Auch bei den Untersuchungen zu DRO1 konnte eine Sekretion beobachtet werden [67]. Des Weiteren besitzt Urb den gleichen strukturellen Aufbau, der wie DRO1 neben dem Signalpeptid am N-terminalen Ende drei Repeat-Regionen enthält, die mit dem C-terminalen Abschnitt von drs zu 30% identisch sind.

Im braunen Fettgewebe von adipösen BRS-3-defizienten Mäusen wird Urb sehr stark exprimiert [66]. Bei adipösen Mäusen wurde Urb hingegen durch den Einfluss von Faktoren wie Insulin, TNF- α und H₂O₂, die bei Fettleibigkeit erhöht und regulatorisch wirksam sind, nur vermindert exprimiert [69]. Zudem wird Urb eine Funktion in der Embryogenese, speziell bei der Entstehung des Knorpelanteils des Skeletts zugeschrieben, da die Expression des Gens während der Embryonalzeit kontinuierlich ansteigt und in vitro im Laufe der Osteogenese wieder zurückgeht [70].

Das Gen wurde auch im Gewebe von Ratten entdeckt. Visconti et al. bezeichneten es hier als **CL2** [68]. Es besitzt wie DRO1 den gleichen strukturellen Aufbau, der neben dem Signalpeptid am N-terminalen Ende drei Repeat-Regionen enthält, die mit dem C-terminalen Abschnitt von drs zu 30% identisch sind [68]. Das Protein scheint sezerniert zu werden und ist sowohl im Nukleus und Nukleolus, als auch im Bereich des Golgi-Apparates lokalisiert. Die verstärkte Expression von CL2 wurde zunächst in der Schilddrüsenzelllinie PC E1A der Ratte, einer Zelllinie, die mit dem Adenovirus E1A transfiziert wurde, nachgewiesen [68]. In normalen, nicht transfizierten PC CL3- Zellen war eine Expression von CL2 jedoch nicht zu beobachten [68].

CL2- Expression konnte auch in vielen humanen Organen nachgewiesen werden, wie beispielsweise in Herz- und Skelettmuskel, Dünndarm, Magen, Milz und Nieren. In Tumorgewebe der Schilddrüse und des Ovars wurde CL2 jedoch nur in geringem Maß oder gar nicht exprimiert, weshalb auch bei Visconti et al. vermutet wurde, dass es sich bei dem Gen um einen möglichen Tumorsuppressor handeln könnte. [68]

DRO 1 wurde in weiteren Studien auch in weißem Fettgewebe von Maus und Mensch identifiziert und wurde von dieser Arbeitsgruppe mit dem Gennamen **Ccdc80** (*coiled-coil domain containing 80*) bezeichnet [67]. Wie in den Untersuchungen zu CL2 konnte auch hier eine sekretorische Freisetzung des Proteins, in diesem Fall von Adipozyten, gezeigt werden [67]. Ccdc80 scheint eine wichtige Rolle in der Adipogenese zu spielen, da es in weißem Fettgewebe stark exprimiert wird. Die Expression wird dabei während der Differenzierung der Adipozyten reguliert und zeigt dabei einen biphasischen Verlauf [67]. Bei der Differenzierung der Adipozyten spielt Ccdc80 dabei eine zweifache Rolle. Es nimmt Einfluss auf Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, indem es hemmend auf Zielgene des Signalweges wirkt. Zusätzlich beeinflusst es die TCF-vermittelte Transkription und die damit verbundene Expression von Adipogenese-Regulatoren, wie PPAR γ und C/EBP α . [67] So scheint eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Fettgewebszellen zu spielen.

Es handelt sich also bei DRO1 (Ccdc80), Urb und CL2 um homologe Gene, die in Geweben verschiedener Lebewesen identifiziert wurden.

Das DRO Protein 1 hat eine Größe von 108kDa und enthält neben zwei Stellen für N-Glykosylierung (AS 667 und 835) mehrere Stellen zur O-Glykosylierung in einer Threonin-reichen Region im Bereich der Aminosäuren 330 und 450. Die Aminosäuresequenzen des Proteins von Ratte und Mensch sind zu 86,3% identisch [11]. DRO1 ist im Zytosol lokalisiert und, anders als *drs*, weder im Zellkern, noch an der Membran nachweisbar. Wie auch in den zu Urb und CL2 erfolgten Untersuchungen konnte eine Sekretion von DRO1/Ccdc80 in den Extrazellulärraum nachgewiesen werden [67].

Die Expression von DRO1 ist im Vergleich zu gesunden Zellen in einer Vielzahl von Pankreas- und Kolonkarzinomzellen herabgesetzt [11]. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Expression von DRO1 in Karzinomzellen ist, dass sog. „*trans-acting repressors*“ an die Promotorregion des Gens binden. Der weit verbreitete Mechanismus der DNA-Methylierung in einem CpG-reichen Areal ist hier vermutlich nicht ausschlaggebend.

Zu den verschiedenen Funktionen von DRO1 gehört nach Re-Expression des Gens in die Karzinomzellen eine Induktion der Abnahme von malignem Wachstum. Des Weiteren hemmt die Expression von DRO1 das „*anchorage-independent growth*“, das Wachstum von Zellen bei Verlust des Kontaktes zum umliegenden Gewebe. Im

Gegensatz zu malignen Zellen können intakte Zellen dies in der Regel nicht überleben, da sie den Kontakt zur extrazellulären Matrix benachbarter Zellen benötigen [96]. Die Form von Apoptose, die induziert wird, wenn sich Zellen von ihrem Zellverband und damit von der extrazellulären Matrix der Nachbarzellen lösen, wird „Anoikis“ genannt. Sie ist besonders von Bedeutung, wenn es im Lauf der Karzinogenese zur Metastasierung kommt. Durch die gewonnene Resistenz der Karzinomzellen gegenüber Apoptose, speziell gegenüber Anoikis, können sich diese vom Tumor lösen und an anderer Stelle im Körper ansiedeln [96]. Es konnte gezeigt werden, dass DRO1 Tumorzellen für diese besondere Form von Apoptose sensitiviert [11].

Zudem wurde beobachtet, dass Zellen, die DRO1 exprimieren für Apoptosestimuli des extrinsischen Apoptoseweges, wie Anti-APO1-/CD95-Antikörper durch die Wirkung von DRO1 verstärkt sensitiviert werden [11].

Da es sich bei DRO1 um ein potenzielles Tumorsuppressorgen handelt, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die Eigenschaften und Wirkungen näher zu charakterisieren.

5. Fragestellung

Das kolorektale Karzinom ist einer der am häufigsten auftretenden malignen Tumoren weltweit. Deshalb ist es besonders wichtig, den Pathomechanismus zu verstehen und dadurch zielgerichtet Pathogenese-orientiert therapeutische Möglichkeiten entwickeln zu können. Eine essenzielle Veränderung in Tumorzellen des Dickdarms ist die verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Weges. Aktiviertes β -Catenin führt dazu, dass eine Vielzahl von Onkogenen aktiviert und vermehrt exprimiert wird. Einige Gene werden hingegen supprimiert. Zu dieser Gruppe gehört das Gen DRO1 (*down-regulated by oncogenes 1*), ein potenzielles Tumorsuppressorgen.

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass DRO1 zum einen bei Re-Expression in Karzinomzellen zur Abnahme von malignem Wachstum führt, zum anderen die Fähigkeit besitzt, Zellen für Apoptosestimuli zu sensitiveren.

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung von DRO1 stellen sich mehrere Fragen:

- 1) Zu Beginn der Forschungen an DRO1 ging man davon aus, dass DRO1 in stabil transfizierten Kolonkarzinomzelllinien gleichmäßig stark exprimiert würde. Nach einer gewissen Zeit der Überexpression nahm die DRO1-Expression jedoch zunehmend ab, da in den polyklonalen Zelllinien die Zellen einen Selektionsvorteil

besitzen, die DRO1 weniger stark exprimieren [11]. Ziel war es daher aus den polyklonalen Kulturen Monoklone zu generieren, die stabil induzierbar DRO1 re-exprimieren.

- 2) Aus vorangegangenen Untersuchungen zu DRO1 ist bekannt, dass DRO1 kolorektale Karzinomzellen für den extrinsischen Apoptoseweg sensitivieren kann, nachdem die Zellen mit Apo1/CD95-Antikörper stimuliert wurden und damit der Fas-Rezeptor aktiviert wurde [11]. Daher stellt sich die Frage, ob DRO1 die kolorektalen Karzinomzellen auch über andere Rezeptoren des extrinsischen Apoptoseweges, wie beispielsweise den TNF-Rezeptor, für Apoptose sensitiveren kann.
- 3) Darauf aufbauend ist von Interesse, ob ein Effekt von DRO1 auch auf andere Apoptosewege nachzuweisen ist und die Zellen für den mitochondrialen Apoptoseweg sensitiviert werden können.
- 4) Neben dem extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg existiert ein dritter Weg, der durch sog. „Stress“ im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums vermittelt wird. Auch hier stellt sich die Frage, ob DRO1 die Karzinomzellen für Apoptosestimuli dieses Apoptoseweges sensitivieren kann.

II) MATERIAL UND METHODEN

1. Reagenzien

Folgende Substanzen, Lösungen und Puffer wurden zur Durchführung der Experimente verwendet.

1.1. Zellkultur

<i>DMEM High Glucose Medium</i>	PAA	Pasching, Österreich
<i>Foetal Bovine Serum Gold</i>	PAA	Pasching, Österreich
<i>Dulbecco's PBS ohne Mg⁺ und Ca²⁺</i>	PAA	Pasching, Österreich
<i>Trypsin EDTA</i>	PAA	Pasching, Österreich
<i>Penicillin/Streptomycin (100x)</i>	PAA	Pasching, Österreich
<i>Hygromycin B Solution</i>	PAA	Pasching, Österreich
<i>Doxycyclin</i>	Fluka	Hamburg, Seelze

1.2. Apoptoseassays

<i>Monoclonal Antibody to Fas (human)</i> (Apo 1-3)	Alexis	Lörrach; Cornerstone Court East, San Diego
<i>Recombinant Protein A</i>	Biovision	Wiesbaden, Illmenau
<i>Recombinant Human TRAIL/ TNFSF10</i>	R&D Systems	Wiesbaden, Minneapolis
<i>Recombinant Human TNF-α/ TNFSF1A</i>	R&D Systems	Wiesbaden, Minneapolis
<i>Actinomycin D from Streptomyces sp.</i>	Sigma	Steinheim
<i>Staurosporine</i>	Calbiochem	Darmstadt
<i>Thapsigargin</i>	Applichem	Darmstadt
<i>DL-Dithiothreitol (DTT)</i>	Sigma	Steinheim
<i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i>	Merck	Darmstadt

Nicolettipuffer: (Ansatz für 200 ml)

Komponente	Hersteller	Menge
0,1% Na Citrat x 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe	227,928 mg
0,1% Triton X-100	LKB Bromma	188,8 μ l
50 μ g/ml Propidiumjodid	Sigma, Steinheim	10,0 ml der Stock-Lsg. (1mg/ml)
Auf 200ml mit d ₂ H ₂ O auffüllen		

<i>Formaldehyd-Lösung 37%</i>	Merck	Darmstadt
<i>bisBenzimide H 33342 trihydrochloride</i>	Sigma-	Darmstadt/
<i>(Hoechst-Lösung)</i>	Aldrich/ Fluka	Hamburg, Seelze

Erläuterungen zu den Substanzen zur Apoptosestimulation:

Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges:

- **Monoclonal Antibody to Fas (human) (Apo 1-3):** Apo1-3 ist ein rekombinanter IgG-Antikörper (Maus), der spezifisch an den Fas/CD95-Rezeptor bindet und dadurch Apoptose induziert [71-72].
- **Protein A:** Protein A ist ein rekombinantes Protein, das aus *E.coli* gewonnen wird und in Kombination mit Apo1-3 verwendet wird, um dessen Wirkung zu induzieren und zu verstärken [73].
- **TRAIL:** Trail (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ist auch unter dem Namen Apo2-Ligand bekannt und gehört der TNF-Liganden-Familie an [74-76]. TRAIL bindet an die TRAIL-Rezeptoren-1(DR4) und -2(DR5). Dabei handelt es sich um Transmembrandomänen, die Todesdomänen enthalten und so in Tumorzellen Apoptose induzieren [38, 77-78]. Die TRAIL-Rezeptoren besitzen eine sehr große Ähnlichkeit mit anderen Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie (s. Abb. 2). Das humane rekombinante TRAIL wird aus *E.coli* gewonnen [79].
- **TNF- α :** Bei TNF- α handelt es sich um ein inflammatorisches Zytokin, das bei Entzündungsvorgängen von Makrophagen und Monozyten produziert wird [80]. Desweiteren ist TNF- α in verschiedene andere Vorgänge wie die Entwicklung des Immunsystems, in Nekrose und Apoptose involviert [79-80]. Durch Eingreifen in die Apoptose reguliert TNF- α beispielsweise die Entwicklung von Lymphgewebe und spielt durch die Aktivierung von Gefäßendothelzellen und Makrophagen eine Rolle bei der Ausbildung von Entzündungsreaktionen [79]. Das für Experimente verwendete rekombinante humane TNF- α wird aus *E.coli*-Bakterien gewonnen und eignet sich, den Rezeptor TNFR1 zu stimulieren und so Apoptose zu induzieren [80-81]. Um die Wirkung von TNF- α zu verstärken, wurde das Antibiotikum Actinomycin D verwendet.
- **Actinomycin D:** Actinomycin D ist ein Antibiotikum, das aus *Streptomyces sp.* gewonnen wird [79]. Actinomycin D wird zudem auch in der Behandlung maligner Neoplasien eingesetzt [45].

Stimulation des intrinsischen Apoptoseweges:

- **Staurosporine:** Diese Substanz ist zur Induktion des intrinsischen Apoptoseweges geeignet [82-83]. Staurosporine wird aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* gewonnen. Ab einer Konzentration von 1 μM [84] wird durch die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien Apoptose induziert.

Stimulation des ER-Stress-vermittelten Apoptoseweges:

- **Thapsigargin:** Bei Thapsigargin handelt es sich um ein Sesquiterpen-Lakton, das aus der Pflanze *Thapsia garginica* gewonnen wird. Thapsigargin ist ein spezifischer Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase im sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulum (SERCA). Es führt zum Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol, indem es sowohl Ca^{2+} -Membran-Kanäle, durch die extrazelluläres Calcium in die Zelle strömen kann, aktiviert, als auch Ca^{2+} -Kanäle im ER und im Sarkoplasmatischen Retikulum, durch die Ca^{2+} aus dem Zytosol in diese Zellorganellen gepumpt würde, blockiert. Des Weiteren hemmt Thapsigargin, unabhängig von Calcium, die Proteinsynthese und frühe Proteinprozessierung [40-41, 85].
- **DTT:** DTT ist eine synthetisch hergestellte Substanz, die u.a. zur Reduktion von Disulfidverbindungen verwendet wird. Außerdem induziert DTT ER-Stress durch die sog. „*unfolded protein response*“ (UPR) [86-87]. DTT bewirkt die Unterbrechung von Proteinfaltungen im Endoplasmatischen Retikulum, was zur fehlerhaften Faltung der Proteine führt. Dadurch werden Kompensationsmechanismen aktiviert, die bei fehlendem Erfolg die Apoptose in der Zelle einleiten [87].

1.3. Western Blot

<i>Reporter Lysis Puffer 5 X</i>	Promega	Mannheim
<i>Benzonase Nuklease</i>	Novagen	Darmstadt
<i>Bovine Serum Albumin (Pulver)/BSA</i>	Sigma	Steinheim
<i>BioRad Protein Assay</i>	BioRAD	München
<i>Precision Plus Protein Standarts All Blue</i>	BioRAD	München

Lämmli-Puffer:

Komponente	Hersteller	Menge
<i>TRIS pH=6,8</i>	Roth, Karlsruhe	125 mM
<i>4% SDS (Sodium dodecyl sulfate)</i>	Fluka, Darmstadt	
<i>Bromphenolblau</i>	Sigma, Darmstadt	1 Msp.

Trenngel (10%): (Ansatz für 10 ml; für ein Gel werden etwa 5 ml verwendet)

Komponente	Hersteller	Menge
<i>d₂H₂O</i>		4,0 ml
<i>1,5 M Tris (pH 8,8)</i>	Roth, Karlsruhe	2,5 ml
<i>30% Acryl-bisacryl-Lösung (30% Acrylamide/Bis Solution)</i>	BioRAD, München	3,3 ml
<i>10% SDS-Lösung (Sodium dodecyl sulfate)</i>	Fluka, Darmstadt	0,1 ml
<i>10% Ammonium-Persulfat</i>	Sigma, Darmstadt	0,1 ml
<i>TEMED (N'N'N'N'-tetra-methyl-ethylenedinamide)</i>	BioRAD, München	0,004 ml

Sammelgel (5%): (Ansatz für 5ml; für ein Gel werden etwa 2,5 ml verwendet)

Komponente	Hersteller	Menge
<i>d₂H₂O</i>		3,4 ml
<i>1,5 M Tris (pH 6,8)</i>	Roth, Karlsruhe	0,63 ml
<i>30% Acryl-bisacryl-Lösung (30% Acrylamide/Bis Solution)</i>	BioRAD, München	0,83 ml
<i>10% SDS-Lösung (Sodium dodecyl sulfate)</i>	Fluka, Darmstadt	0,05 ml
<i>10% Ammonium-Persulfat</i>	Sigma, Darmstadt	0,05 ml
<i>TEMED (N'N'N'N'-tetra-methyl-ethylenedinamide)</i>	BioRAD, München	0,005 ml

10X-SDS-Laufpuffer:

Komponente	Hersteller	Menge
0,25 M TRIS Base	Roth, Karlsruhe	30,3 g
1,92 M Glycine	Roth, Karlsruhe	144,0 g
1% SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Fluka, Darmstadt	10g
Auf 1000ml mit d ₂ H ₂ O auffüllen		

10X-Transferpuffer:

Komponente	Hersteller	Menge
1 M TRIS Base pH 8,0 (fc.:40 mM)	Roth, Karlsruhe	80,0 ml
3 M NaOAc pH 8,0 (fc.:20 mM)	Roth, Karlsruhe	13,3 ml
0,5 M EDTA pH 7,4 (fc.:2mM)	Sigma, Darmstadt	8,0 ml
10% SDS-Lsg. (fc.:0,05% w/v)	Fluka, Darmstadt	10,0 ml
MeOH (fc.:20% w/v)	Merck, Darmstadt	400,0 ml
Auf 2000ml mit d ₂ H ₂ O auffüllen		

25X TBS:

Komponente	Hersteller	Menge
TRIS Base	Roth, Karlsruhe	60 g
NaCl	Sigma, Darmstadt	200g
12 N HCl	Roth, Karlsruhe	7,9 ml
Auf 1000ml mit d ₂ H ₂ O auffüllen und auf pH 7,6 einstellen		

1X TBS-T:

Komponente	Hersteller	Menge
25X TBS		40 ml
Tween 20	Roth, Karlsruhe	2 ml
Auf 2000ml mit d ₂ H ₂ O auffüllen		

<i>Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk</i>	BioRAD	München
<i>Super Signal West Pico (ECL-Lösung)</i>	Pierce	Rockford, IL
<i>HA-AK / Rat monoklonal antibody, Clon 3F10</i>	Roche	Grenzach- Wyhlen
<i>Caspase-8-Antikörper (Caspase-8 Mouse mAb)</i>	Cell Signaling	Danvers
<i>Actin-AK / Mouse-Actin Immuno</i>	MP Bio	Heidelberg
<i>Anti-rat-AK / goat Anti-rat IgG-HRP</i>	GE Healthcare	München
<i>Anti-mouse-AK</i>	GE Healthcare	München
<i>Ponçeau-Rot-Färbung</i>	Sigma-Aldrich	Darmstadt

India Ink-Färbung:

Komponente	Hersteller	Menge/Konz.
<i>PBS</i>	PAA, Cölbe	
<i>Tween 20</i>	Roth, Karlsruhe	0,3 %
<i>Pelikan Fount India Ink</i>	Pelikan AG, Hannover	1µg/ml PBS-TW

2. Methoden

2.1. Zellkultur

Für alle durchgeführten Versuche wurden die Kolonkarzinomzelllinien DLD1 und HCT 116 verwendet. Diese Zelllinien wurden bereits in früheren Experimenten mit dem Expressionsvektor **pRTS-1 DRO1-HA** stabil transfiziert [88]. Mithilfe dieses Vektorsystems kann DRO1-HA Doxycyclin-abhängig induzierbar exprimiert werden [88]. Das Hämagluttinin(HA)-Epitop ist dabei an das Carboxy-terminale Ende des Gens fusioniert.

Zunächst wurde mit polyklonalen HCT 116/DRO1 und polyklonalen DLD1/DRO1 Zellen gearbeitet.

Die Zellen wurden in *DMEM High Glucose Medium* mit 10% *FCS (Foetal Bovine Serum Gold)* und 1% Penicillin/Streptomycin und zusätzlich *Hygromycin B* für die Selektion bis zu einer Konfluenz von etwa 80% in 10 cm-Zellkulturschalen der Firma *Falcon (Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ)* bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Hygromycin B wurde abhängig von der Zelllinie in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt:

Zelllinie	Hygromycin-Konzentration
DLD1 DRO1	700 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ Medium
HCT 116 DRO1	600 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ Medium

Für die Passagierung wurden die Zellen zunächst im Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung beurteilt. Dann wurden sie zweimal mit auf 37°C angewärmtem *Dulbecco's PBS ohne Mg⁺ und Ca²⁺* gewaschen. Zum Ablösen des Zellrasens wurden die DLD1-Zellen für ca. 3 Minuten, die HCT116-Zellen für einige Sekunden bei 37°C im Brutschrank mit 1,5 ml *Trypsin EDTA* inkubiert, bis sich die Zellen abrundeten und vom Plattenboden lösten. Nach Abspülen der Zellen von der Kulturschale wurden sie in frischem, serumhaltigem Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie in der Neubauer-Zählkammer gezählt und für 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden entsprechend dem durchzuführenden Experiment in bestimmter Zellzahl oder nach Erfahrungswerten auf verschiedene Zellkulturschalen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Vereinzeln der Zelllinien

Um aus den polyklonalen Zelllinien monoklonale Kulturen zu gewinnen, wurden beide Zelllinien sehr dünn (jeweils 1×10^4 , 2×10^4 und 5×10^4 Zellen pro Platte) in 10cm-Kulturschalen ausgesät. Nach einigen Wochen (Wachstumsgeschwindigkeit abhängig von der Zelllinie), kam es zur Bildung kleiner Einzelzellkolonien, die mit einer Pipettenspitze in 96-Loch-Platten (*Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA*) überführt und schließlich, wie oben beschrieben, kultiviert und passagiert wurden, bis die Kultur in 6cm-Schalen gehalten werden konnte.

Um die DRO1-Expression der einzelnen monoklonalen Zelllinien zu testen, wurden die Zellen in 12-Loch Platten ausgesät und für 48 Stunden mit *Doxycyclin* in einer

Konzentration von 1µg/ml stimuliert. Dadurch wurde die DRO1-Expression in den Zellen aktiviert. Anschließend wurden sie im Fluoreszenzmikroskop (*Zeiss, München/Göttingen*) untersucht. Die Kolonien, die DRO1 exprimierten, leuchteten bei Einstellung mit einem speziellen Filter grün. Der Expressionsvektor pRTS-1 DRO1, mit dem die Kolonkarzinomzellen transfiziert wurden, kodiert neben DRO1-HA auch für GFP (*green fluorescent protein*). Nach Stimulation mit Doxycyclin wird neben DRO1 damit GFP exprimiert, das unter Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann.

Zusätzlich wurden die Zellen im Western Blot (s. unten) analysiert. Die Zelllinien, die DRO1 exprimierten, zeigten eine Bande bei 109,5kDa, da sie ein HA-Epitop besitzen, das mittels HA-Antikörper nachweisbar ist.

Es konnten mehrere monoklonale DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1- Zelllinien gewonnen werden.

Die monoklonalen Zelllinien wurden folgendermaßen benannt:

DLD1/DRO1 #54	→	DLD1/DRO1 #A
DLD1/DRO1 #56	→	DLD1/DRO1 #B
DLD1/DRO1 #58	→	DLD1/DRO1 #C
DLD1/DRO1 #70	→	DLD1/DRO1 #F
DLD1/DRO1 #36	→	DLD1/DRO1 #G
DLD1/DRO1 #4	→	DLD1/DRO1 #I

HCT116/DRO1 #3	→	HCT116/DRO1 #A
HCT116/DRO1 #19	→	HCT116/DRO1 #C
HCT116/DRO1 #42	→	HCT116/DRO1 #F
HCT116/DRO1 #45	→	HCT116/DRO1 #G

Die nachfolgenden Versuche wurden mit den **polyklonalen HCT116/DRO1 Zellen** und exemplarisch für die monoklonalen Zelllinien mit **DLD1/ DRO1 #A** durchgeführt.

2.2. Apoptoseassays

Um den Einfluss von DRO1 auf die verschiedenen Apoptosewege zu untersuchen, wurden die Zellen in Gegenwart von DRO1, mit dem monoklonalen Antikörper Apo1-3, mit TRAIL und TNF- α zur Stimulation der Rezeptor-vermittelten Apoptose, mit

Staurosporine zu Stimulation des intrinsischen Apoptoseweges und mit Thapsigargin und DL-Dithiothreitol (DTT) zur Stimulation des durch ER-Stress vermittelten Apoptoseweges behandelt.

2.2.1. Messung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden am Tag 1 in 12-Loch-Platten (*Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ, USA*) ca. 8×10^4 /Loch in 1 ml des oben erwähnten DMEM-Mediums mit Hygromycin B ausgesät. Am Tag 2 wurde ein Teil der Zellen in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ mit Doxycyclin stimuliert, um dadurch die Expression von DRO1 zu induzieren. Am Tag 3 wurden alle Zellen mit den einzelnen Apoptosestimuli inkubiert, um die verschiedenen Apoptosemechanismen auszulösen.

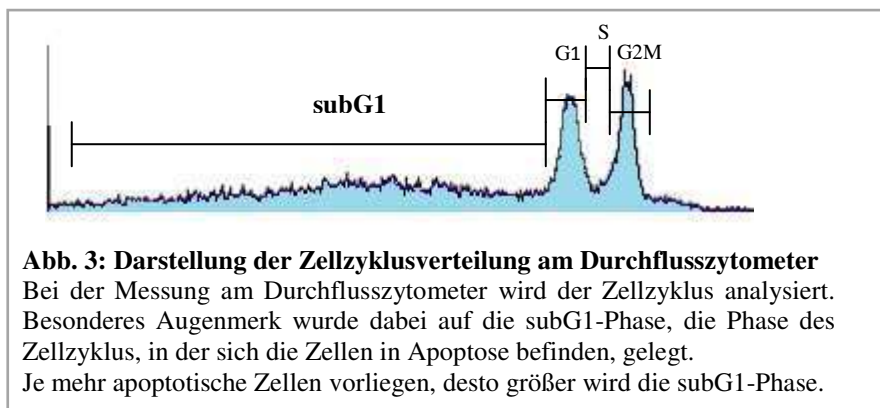
Apoptoseweg	Substanz	Zeit	Konzentration
Extrinsischer Apoptoseweg	Apo 1-3 + Protein A	24 h	2,0-250 ng/ml
	Trail	24h	0,1- 2,0 ng/ml
	TNF- α + Actinomycin D (0,2 μg)	16 h	0,001- 1,0 ng/ml
Intrinsischer Apoptoseweg	Staurosporine	4 h	1-50 μM
ER-Stress-vermittelter Apoptoseweg	Thapsigargin	24 h	1-50 μM
	DL- Dithiothreitol (DTT)	24 h	1-100 μM

Am Tag 4 wurden die Zellen nach entsprechend langer Stimulationszeit (s. Tabelle) geerntet. Dazu wurden die Zellen auf Eis gehalten und zusammen mit dem Medium, in dem apoptotische Zellen schwammen, mit Plastikschabern von den Platten entfernt. Die Zellsuspensionen wurde jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße (*Sarstedt, Nümbrecht*) überführt und bei Raumtemperatur für 60 Sekunden bei 13 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nach Abnehmen des Überstandes mit gekühlten *Dulbecco's PBS ohne Mg⁺ und Ca²⁺* gewaschen und erneut zentrifugiert.

Die Analyse der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Um die Messung am Durchflusszytometer durchführen zu können, wurden die Zellen mit Propidiumjodid angefärbt. Dazu wurden die Zellpellets in 200 μl *Nicoletti-Puffer* resuspendiert und für etwa 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Die Messung der Zellzyklusverteilung und insbesondere der Apoptosephase, der **subG1-Phase**, erfolgte am Durchflusszytometer *FACS Calibur* der Firma *Becton Dickinson* (*Franklin Lakes/NJ, Heidelberg*). Dabei werden die Zellen nach ihrem DNA-Gehalt unterschieden. So kann die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus, in denen sich die Zellen befinden, ermittelt werden. Für die Bestimmung der Apoptoserate ist die sub G1-Fraktion relevant (s. Abb. 3)

Es wurden 100 µl der Propidiumjodid-markierten Zellsuspension mit 200 µl PBS verdünnt. Nach Anleitung des Gerätes wurden die Zellen im *FACS Calibur* analysiert und die Ergebnisse mit *BD CellQuest™ Pro Software* (*BD Biosciences; Franklin Lakes/NJ, Heidelberg*) ausgewertet.



2.2.2. Hoechst-Staining 33342

Ein weiteres Verfahren zur Messung von Apoptose ist das sog. **Hoechst-Staining**.

Dabei werden Zellen mit der sog. Hoechst-Lösung (*bisBenzimide H33342 trihydrochloride / Hoechst H33342*) (Konzentration 5µg/ml) angefärbt, die es möglich macht, im Fluoreszenzmikroskop zwischen apoptotischen Zellen und Zellen in anderen Phasen des Zellzyklus zu unterscheiden.

Die stabil transfizierten Zellen wurden am Tag 1 8×10^4 Zellen/Loch in 12-Loch-Platten in 1 ml DMEM Medium mit Hygromycin B ausgesät. Am Tag 2 wurde die Hälfte der Löcher einer Platte mit Doxycyclin (1µg/ml) und am Tag 3 mit **Apo1-3** und **Protein A** (125ng/ml + 2,5ng/ml DLD1/DRO1 und HCT116/DRO1), mit **TRAIL** (DLD1/DRO1 0,5ng/ml; HCT116/DRO1 1,0ng/ml) und mit **TNF-α** (DLD1/DRO1 2,0ng/ml;

HCT116/DRO1 0,1ng/ml) und 0,2µg/ml **Actinomycin** nach dem gleichen Schema wie für die Versuche der Durchflusszytometrie stimuliert, um den Effekt von DRO1 auf den extrinsischen Apoptoseweg zu untersuchen.

Am Tag 4 wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen dann bei 4°C für 20 Minuten in 1 ml 4% Formaldehyd (Formaldehydlösung, mind. 37%) fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 5 Minuten bei langsamer Schwenkbewegung bei Raumtemperatur in TBS-T gewaschen. Nach Absaugen des TBS-T wurden die Zellen für etwa 30 Minuten bei 4°C mit der in TBS-T verdünnten Hoechst-Lösung (Konzentration 5µg/ml) (*bisBenzimide H33342 trihydrochloride / Hoechst H33342*) angefärbt. Nach 30 Minuten wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop (*Zeiss*) analysiert und fotografiert. Die apoptotischen Zellen zeigten einen scholligen Umbau des Chromatins aufgrund von Kondensation des Kerns und DNA-Fragmentierung [89] und hatten deshalb ein stärker leuchtendes Signal, als die lebenden Zellen, die eher blass erschienen. Um das Experiment auszuwerten, wurden die Zellen gezählt und der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen berechnet.

2.3. Western Blot und Immundetektion

Um bestimmte Proteine nachweisen zu können, wurde die Methode des Western Blots und der Immundetektion etabliert.

2.3.1. Herstellung der Zelllysate

Zunächst wurden Zelllysate hergestellt. Dazu wurden am Tag 1 monoklonale DLD1/DRO1#A- und polyklonale HCT116/DRO1-Zellen in einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen auf 10cm-Zellkulturschalen in 10 ml DMEM-Medium mit der entsprechenden Konzentration Hygromycin B (siehe oben) ausgesät. Am Tag 2 wurden sie zur Hälfte in einer Doxycyclin in der Konzentration 1µg/ml stimuliert. Am Tag 3 wurden die Zellen dann zur Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges mit **Ap01-3** (125 ng/ml) und **Protein A** (2,5 ng/ml) stimuliert und im Brutschrank 24 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden am Tag 4 die Zellen geerntet und in ein 15 ml Reaktionsgefäß (*Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ*) überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 1 ml gekühltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml

Reaktionsgefäß (*Sarstedt, Nümbrecht*) überführt. Ein kleiner Teil dieser Zellsuspension wurde zur Beurteilung des Effekts von DRO1 im Durchflusszytometer, wie oben beschrieben, analysiert. Der Rest der Suspension wurde erneut in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1X *Reporter Lysis Puffer* (Reporter Lysis Puffer 5X in Aqua dest. 1:5 verdünnt) resuspendiert. Abhängig von der Pelletgröße wurden zwischen 20 und 60 µl des Lysepuffers verwendet.

Anschließend wurden die Proben für mindestens 15 Minuten im Eisbad gekühlt oder zur späteren Verarbeitung bei -40°C eingefroren. Um vorhandene genomische DNA in den Proben abzubauen, wurde der Zellsuspension 1µl *Benzonase-Nuklease* (25 U/µl) zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anmerkung: Beim Vorbereiten der Lysate für den Western Blot im Rahmen des Vereinzeln der Zellen wurden die Zellen bereits nach 24 Stunden Doxycyclin-Stimulation geerntet, da in diesem Experiment nur die Expression von DRO1 untersucht wurde und nicht die verschiedenen Apoptosewege.

2.3.2. Proteinbestimmung

Um die Proteinmenge in den einzelnen Lysaten bestimmen zu können, wurde die **Proteinbestimmung nach Bradford** gewählt.

Dazu musste zunächst eine Standardkurve erstellt werden, indem jeweils 0µl, 0,5µl, 1µl, 2µl, 4µl und 8µl in TBS-T gelöstem *Bovine Serum Albumin (BSA, 1 mg/ml)* je zweimal in Eppendorfgefäße pipettiert wurden. Auch die zu untersuchenden Proben wurden nach kurzem Vortexen jeweils 0,5µl in ein Eppendorfgefäß überführt.

Die Bradford-Reagenz (*BioRAD Protein Assay*) wurde 5-fach mit destilliertem Wasser verdünnt und je 1 ml der Lösung zu den Proben gegeben. Dabei kommt es zur Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine und das Absorptionsmaximum der Farben verschiebt sich von 465nm (ohne Protein) nach 595nm (mit Protein). Das bedeutet, eine Zunahme der Absorption ist ein Maß für die Proteinmenge [90].

Die Proben mit der Bradford-Lösung wurden kurz geschüttelt und in Küvetten gefüllt, mit denen die Absorption bei 595nm im Photometer *Ultrospec™ 3100 pro (Biochrom Ltd; Cambridge, Bremen)* gemessen wurde. Mit Hilfe von Excel wurden anhand der Standardkurve aus den Ergebnissen des Photometers die Proteinkonzentrationen für die verschiedenen Lysate berechnet.

2.3.3. Vorbereitung der Proben für die Protein-Gelelektrophorese

Entsprechend der berechneten Proteinmenge wurden 20-40 µg des Lysates, eine Positivkontrolle und 5 µl Proteinmarker (*Precision Plus Protein Standards All Blue*) jeweils in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und wenn nötig mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Zum Anfärben der Proben wurden 450µl *2X Lämmli-Puffer* mit 50µl 1M *DL-Dithiothreitol (DTT)* gemischt. DTT bewirkt eine Reduktion der Proteine. Die vorbereiteten Proben, einschließlich Positivkontrolle und Marker, wurden mit jeweils 10 µl des Lämmli-DTT-Puffers aufgefüllt, kurz gemischt und anschließend bei 95°C im Heizblock für 5 Minuten gekocht, um die Proteine zu denaturieren.

2.3.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mit dem System *Mini-Protean3/TetraCell* der Firma *BioRad (München)* durchgeführt. Dazu wurden zunächst 2 Glasplatten in eine Halterung gespannt, um ein Acrylamidgel gießen zu können, in welchem später die Proben durch ein elektrisches Feld laufen sollten.

Das SDS-Acrylamid-Gel bestand aus Trenn- und Sammelgel, die nach Anleitung von Roche hergestellt wurden (siehe dazu II.1.3)

Zunächst wurde das noch flüssige Trenngel zwischen die beiden Glasplatten gefüllt. Pro Gel wurden ca. 5 ml des Trenngels verwendet.

Nachdem das Gel zwischen die Platten gefüllt worden war, wurde es mit ca. 1 ml 0,1% SDS überschichtet, um zu verhindern, dass das Gel austrocknet. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb etwa 30 Minuten. Anschließend wurde das SDS vorsichtig abgeschüttet und das flüssige Sammelgel über das festgewordene Trenngel gefüllt. Beim Sammelgel wurden pro Gel ca. 2,5 ml benötigt. Die Platte wurde bis zum Rand mit Sammelgel gefüllt und anschließend ein Kamm mit 1 mm Dicke zwischen die Glasplatten eingebracht als Platzhalter, um Taschen für die Proben in das Gel zu formen. Das Sammelgel benötigte ebenfalls ca. 30 Minuten für die Polymerisation.

Die vorbereiteten Proben (s. oben) wurden nun, nachdem das Gel auspolymerisiert und fest war, in die Taschen gefüllt. Dazu wurden zunächst die Glasplatten samt Gel und Halterung in einer Elektrophoresekammer nach Anleitung der Hersteller befestigt und diese mit 1 Liter 1X-SDS-Laufpuffer (Rezept siehe II.1.3) aufgefüllt. Dazu wurde 10X-Laufpuffer im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Pro Probe wurden etwa 20-30µg der vorbereiteten Proteinlösungen in die Taschen gefüllt. Zusätzlich wurden pro

Gel auch immer eine Positivkontrolle und ein Proteinmarker in die Taschen eingebracht. Die Kammer wurde geschlossen und die Proben liefen in einem elektrischen Feld für 15 Minuten bei 100V und anschließend für etwa 45 Minuten bei 200 V durch das Gel, bis der Marker den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

2.3.5. Western Blot

Unter dem eigentlichen Western Blot versteht man das Übertragen von Proteinen auf eine Membran. Dazu wurde das Gel nach abgelaufener Elektrophorese vorsichtig aus den Glasplatten gelöst und auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran (*Millipore; Billerica/MA, Schwalbach*) gelegt, die zuvor etwa 1 Minute in Methanol quellen musste [90]. Die Bindung der Proteine an diese Membran erfolgt über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Da es sich bei diesen Bindungen um nicht-kovalente handelt, können die Proteine wieder von der Membran entfernt werden [90].

Gel und Membran wurden zwischen 2 Filterpapieren (*Whatman; Dassel*) und 2 Schwämmen in eine Kassette gespannt und diese in eine *Elektrophoresekammer* gesteckt. Die Kammer wurde mit einem Eisbehälter, einem Rührfisch und 1 Liter gekühltem 1X-Transferpuffer gefüllt. Der 10X-Transferpuffer wurde dazu ebenfalls im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Um den Transfer durchführen zu können, wurde die geschlossene Kassette auf einen Magnetrührer gestellt und bei 400 mA für 1 Stunde ans Stromnetz angeschlossen. Nach einer Stunde wurde die PVDF-Membran aus der Kassette genommen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit einer 5% Milch-Lösung geblockt, um die noch freien Proteinbindungsstellen abzusättigen. Für die Blocking-Lösung wurden 5% (w/v) Milchpulver (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk) in TBS-T gelöst.

2.3.6. Immundetektion

Um verschiedene Proteine nachweisen zu können, wurde eine Immundetektion durchgeführt.

Nach Entfernen der Blocking-Lösung wurde die Membran kurz mit 1X TBS-T gewaschen. Die gewaschene Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken mit der Primärantikörper-Lösung

inkubiert. Dazu wurde der Antikörper in 1 % Milchlösung verdünnt. Das Verdünnungsverhältnis war abhängig vom jeweiligen Antikörper.

Die Antikörper-Lösung wurde verworfen und die Membran zweimal kurz und zweimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit der dem Primärantikörperlösung entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde 1:10 000 mit 1% Milch-Lösung verdünnt.

Der Sekundärantikörper wurde verworfen und die Membran wiederum zweimal kurz und zweimal für 20 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Danach wurde die Membran mit einem Detektionsreagenz (ECL-Lösung, Super Signal West Pico) in Plastikfolie eingeschweißt und nach etwa 20 Minuten in eine Filmkassette zur Belichtung eines Röntgenfilms (Thermo CL-X Posure; *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) eingelegt. In Abhängigkeit vom Antikörper wurden die Filme nach unterschiedlich langen Belichtungszeiten im Entwicklungsgerät Curix 60 (*Agfa, Köln*) entwickelt.

Übersicht über die verwendeten Antikörper:

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
HA-AK	1 : 2 000	Anti-rat-AK	1 : 10 000
Caspase-8-AK	1 : 1 000	Anti-mouse-AK	1 : 10 000
Actin-AK	1 : 2 000	Anti-mouse-AK	1 : 10 000

2.3.7. Färbemethoden

Um nachweisen zu können, ob sich gebundene Proteine auf einer Membran befinden, wurden die Membranen mit verschiedenen Methoden angefärbt.

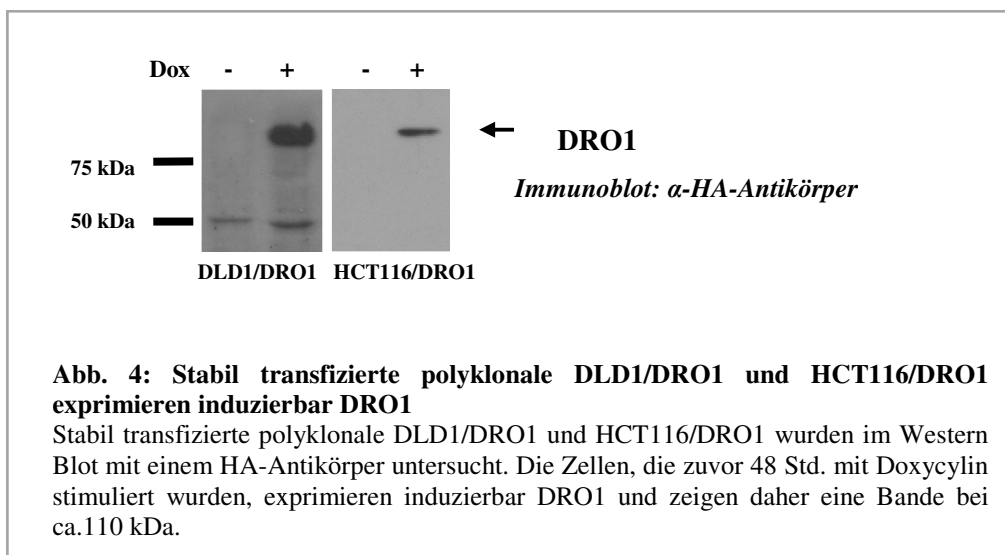
Die sog. **Ponceau-Färbung** ist eine reversible Färbung. Die Membran wurde dabei für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur in Ponceau-Rot, das in 3% Trichloressigsäure verdünnt ist, inkubiert. Überschüssige Farbe wurde mit Wasser vorsichtig abgespült. So wurden proteinreiche Banden sichtbar gemacht. Durch Waschen der Membran in Blocking-Lösung (s. oben) ließ sich die Farbe wieder entfernen [90].

Bei der **India-Ink-Färbung** handelt es sich um eine irreversible Färbung. Kohlenstoffpartikel der Tusche verbinden sich mit den immobilisierten Proteinen, die auf der Western-Blot-Membran gebunden sind. Es handelt sich um eine sehr sensitive Methode [91]. Nachdem die geblottete Membran 4x für 10 Minuten in PBS, das 0,3% Tween 20 enthält, gewaschen worden war, um Reste des Acrylamidgels und des SDS auf der Membran zu entfernen, wurde sie über Nacht in der India-Ink-Lösung inkubiert. Anschließend wurde sie mit deionisiertem Wasser abgespült [92].

III) ERGEBNISSE

1. Generierung monoklonaler kolorektaler Karzinomzelllinien, die induzierbar DRO1 exprimieren

Ausgehend von humanen kolorektalen Karzinomzelllinien sollten monoklonale Zellen generiert werden, die den Tumorsuppressorkandidaten DRO1 induzierbar exprimieren können. Bommer et. al haben gezeigt, dass die stabile Transfektion mit dem konstitutiv-exprimierenden DRO1-Molekül bereits nach wenigen Passagen zu einer Abnahme der DRO1-Expression führt [11]. Daher wurden für die vorliegende Arbeit kolorektale Karzinomzelllinien, wie DLD1 und HCT116, stabil mit einem Doxycyclin-induzierbaren Vektor transfiziert, der für Hämagglutinin (HA)-Epitop-markiertes DRO1 kodiert [88]. Der Nachweis der Expression von DRO1 erfolgte im Immunblot über das HA-Epitop (Abb. 4).



Bei den entstandenen Zellen handelte es sich um polyklonale DRO1-exprimierende Zelllinien, aus denen dann monoklonale Zelllinien generiert wurden, indem die polyklonalen Zellen vereinzelt und expandiert wurden.

Neben DRO1 exprimieren die Zelllinien DLD1/DRO1 und HCT116/DRO1 nach Stimulation mit Doxycyclin auch das fluoreszierende Protein GFP (*green fluorescent protein*), welches mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann und so indirekt eine Aussage über die Expression von DRO1 zulässt [88].

Um zu untersuchen, ob die neu gewonnenen monoklonalen DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1-Zellen tatsächlich DRO1 exprimierten, wurden die Zellen nach Stimulation mit Doxycyclin im Fluoreszenzmikroskop bezüglich der GFP-Expression beurteilt. Die stimulierten Klone zeigten im Fluoreszenzmikroskop ein Leuchtsignal (Abb.5) und wurden anschließend im Immunblot weiter analysiert. Das HA-Immundefektion mit einem monoklonalen HA-Antikörper nachgewiesen werden. Die DRO1-exprimierenden Klone (DLD1/DRO1 #A, #B, #C, #F, #G, #I und HCT116/DRO1 #A, #C, #F, #G) zeigten dabei eine Bande für DRO1 bei ca. 110 kDa (siehe Abb. 6).

Exemplarisch für die monoklonalen DLD1/DRO1-Zellen wurden die folgenden

Versuche mit DLD1/DRO1 #A durchgeführt. Für HCT116/DRO1 wurden für die Versuche die polyklonale Zelllinie verwendet, da eine Etablierung monoklonaler HCT116/DRO1-Zelllinien zwar gelang, weitere Versuche jedoch bedauerlicherweise nicht möglich waren, da die monoklonalen HCT116/DRO1-Zellen bereits nach etwa 8 Passagen in der Zellkultur die DRO1-Expression wieder verloren.

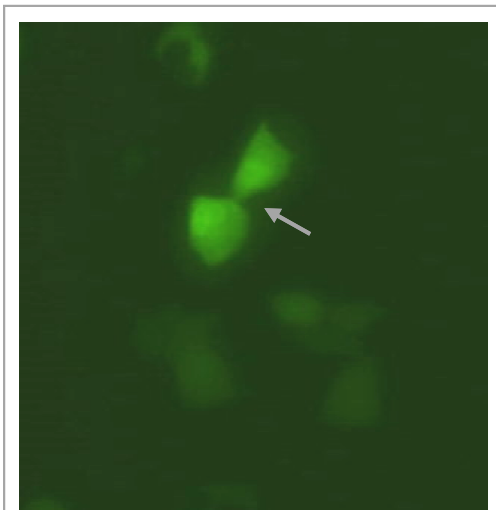
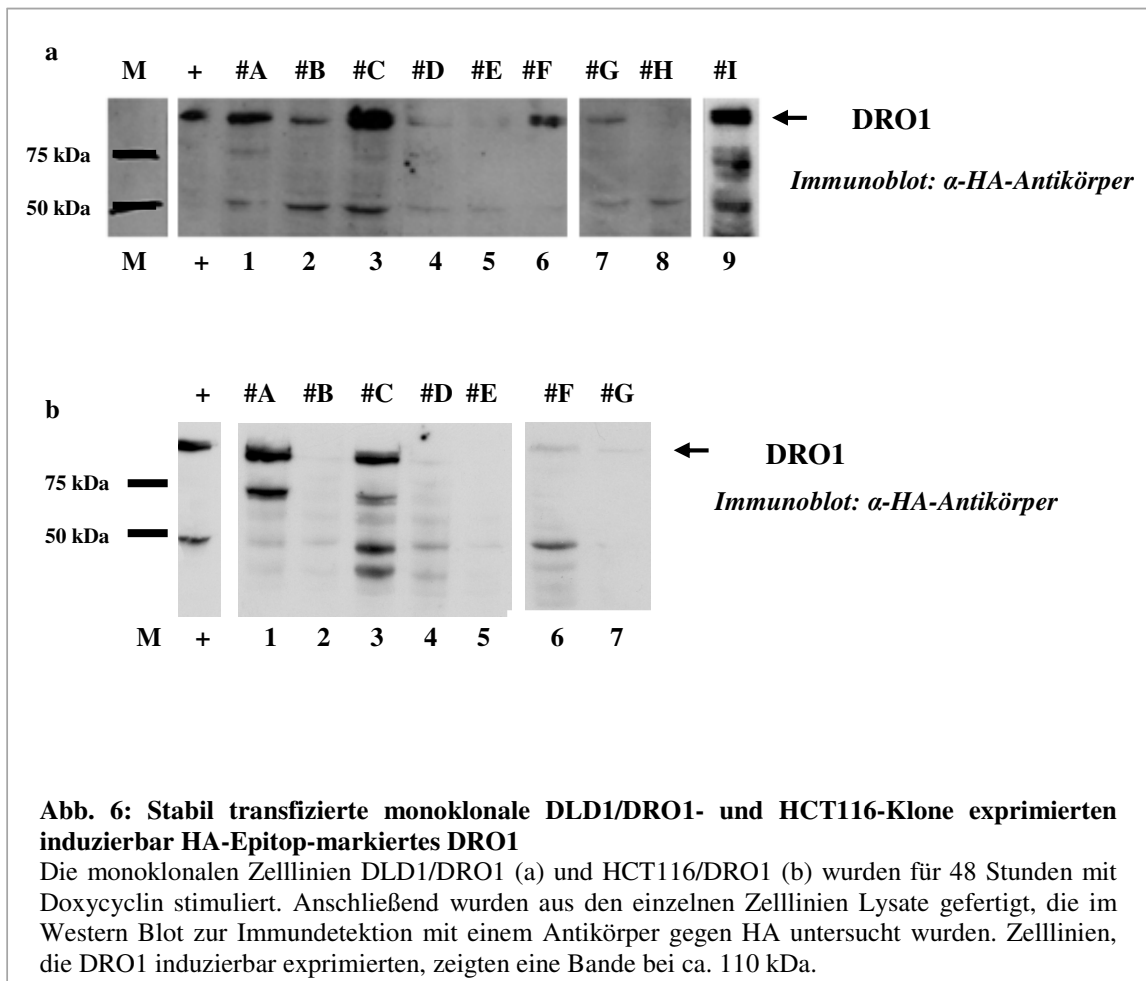


Abb. 5: GFP-Expression bei monoklonalen, stabil transfizierten DLD1/DRO1-Zellen

Stabil transfizierte Zellen wurden für 48 Stunden mit Doxycyclin stimuliert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Zellen, die GFP exprimierten, zeigten ein Leuchtsignal (siehe Pfeil).



2. DRO1 reguliert Apoptose über den extrinsischen Apoptoseweg

In vorangegangenen Experimenten war gezeigt worden, dass die Expression von DRO1 Einfluss auf die apoptotischen Vorgänge in der Zelle nimmt und HCT116-Zellen mit konstitutiv-aktiver DRO1-Expression für den Fas-vermittelten Apoptoseweg sensitiviert [11]. Daher stellte sich zum einen die Frage, ob diese Sensitivierung für weitere kolorektale Karzinomzelllinien reproduzierbar ist, und zum anderen, ob die DRO1-Expression auch andere Rezeptoren des extrinsischen Apoptoseweges (siehe Abb. 2) beeinflusst. Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Untersuchungen, bei denen Zellen mit konstitutiv-aktiver DRO1-Expression verwendet wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Zellen, die DRO1 induzierbar exprimieren, gearbeitet.

Von relevanter Apoptose wurde bei der Auswertung der Experimente bei einem Anstieg der Apoptoserate um mehr als 10% durch die Expression von DRO1 und gleichzeitiger Stimulation mit einem der Apoptosestimuli ausgegangen.

Zur Untersuchung des extrinsischen Apoptoseweges wurden drei verschiedene Todesrezeptoren, der Fas/CD95-Rezeptor, der TRAIL-Rezeptor-1/-2 und der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), stimuliert.

Zunächst wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper Apo 1-3, der an den Fas-Rezeptor bindet, behandelt und die Phasen der Zellzyklusverteilung, insbesondere die subG1-Phase, im Durchflusszytometer analysiert.

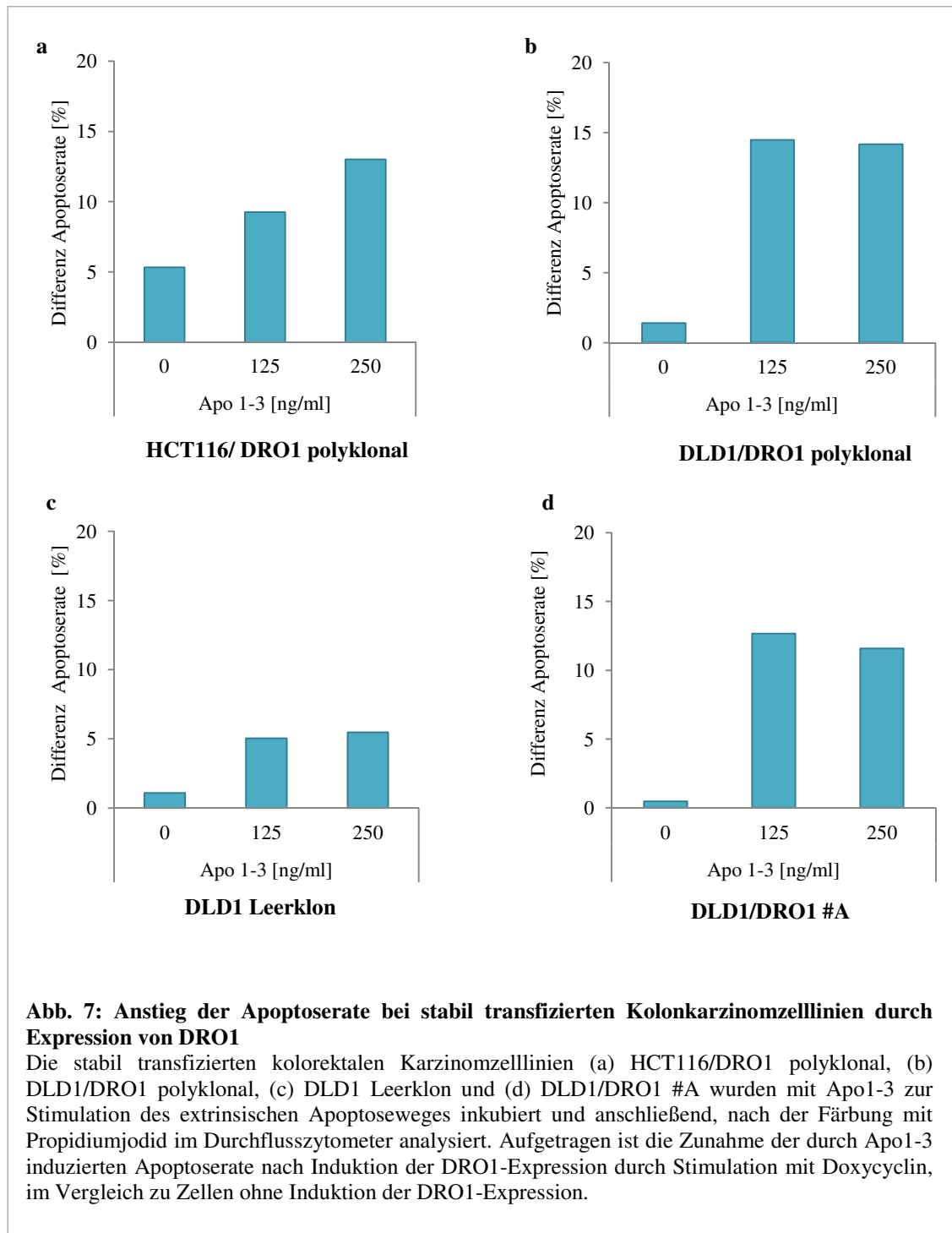
Dabei sollte zu Beginn untersucht werden, ob die Ergebnisse, die aus vorangegangenen Versuchen mit konstitutiv DRO1-exprimierenden Zellen durchgeführt wurden, auch auf die Zellen mit induzierbarer DRO1-Expression übertragbar sind. Hierzu wurden zunächst polyklonale HCT116/DRO1-Zellen verwendet. Es zeigte sich, dass es durch die Expression von DRO1 nach Stimulation mit Doxycyclin und gleichzeitiger Stimulation mit Apo1-3 im Vergleich zu Zellen, bei denen die Expression des Gens nicht induziert wurde, zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate um mehr als 10% kam (siehe Abb. 7a).

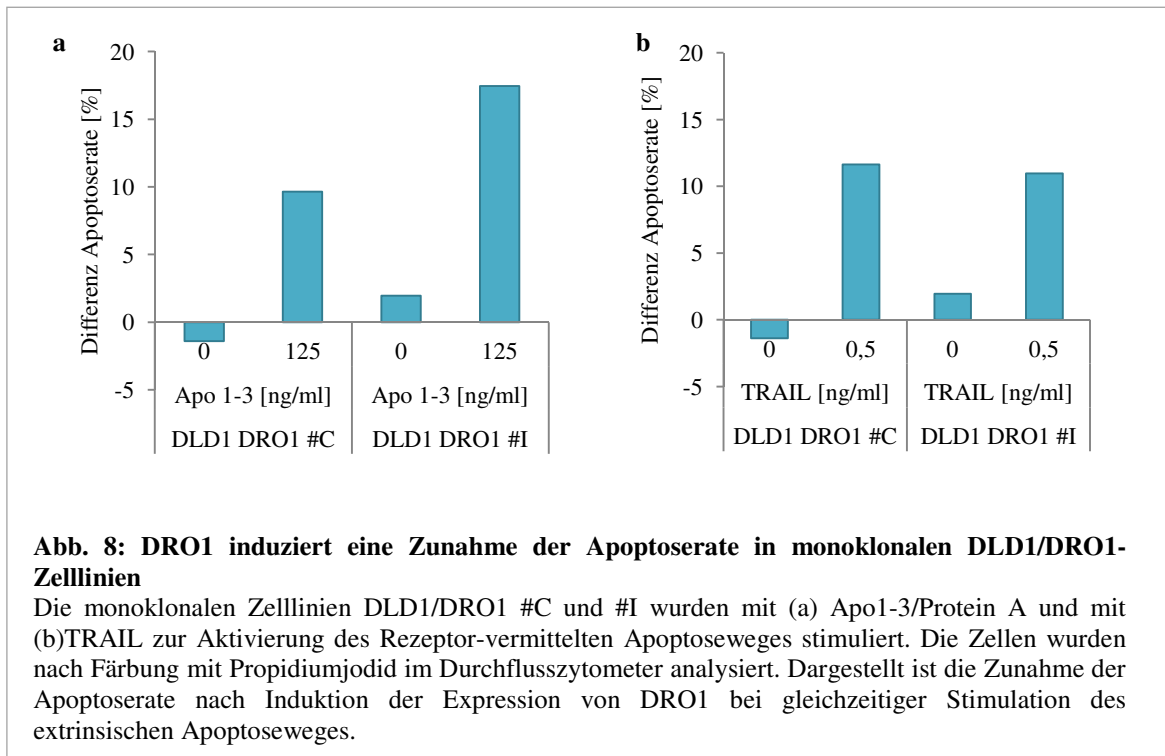
Wie bei den polyklonalen HCT116/DRO1-Zellen konnte dies auch in den Untersuchungen mit polyklonalen DLD1/DRO1-Zellen gezeigt werden (siehe Abb. 7b). Im Vergleich dazu konnte bei polyklonalen DLD1-Zellen, die anstelle von DRO1 ursprünglich mit einem Leervektor transfiziert worden waren, dieser Effekt nach Stimulation mit Doxycyclin nicht nachgewiesen werden. Damit wurde gezeigt, dass die Steigerung der Apoptoserate nicht auf dem Effekt von Doxycyclin, sondern auf dem von DRO1 beruht (siehe Abb. 7c).

Da es sich bei den polyklonalen Zelllinien um eine gemischte Zellpopulation handelt, in der die einzelnen Zellen unterschiedlich stark DRO1 exprimieren, wurden monoklonale DLD1/DRO1-Klone etabliert, die stabil induzierbar DRO1 exprimieren. Auch die monoklonalen DLD1/DRO1-Zelllinien zeigten, wie die polyklonalen Zelllinien, einen Anstieg der Apoptoserate bei Expression von DRO1 (Abb. 7d).

Aufgrund des konstanteren Verhaltens der Zellen bezüglich ihrer DRO1-Expression wurden die folgenden Untersuchungen exemplarisch für die Zelllinie DLD1/DRO1 mit der monoklonalen Zelllinie DLD1/DRO1 #A durchgeführt. Aus den vorliegenden Ergebnissen der Versuche mit weiteren monoklonalen DLD1/DRO1-Zelllinien zeigte sich, dass die monoklonalen und polyklonalen Zelllinien in ihrem Verhalten identisch

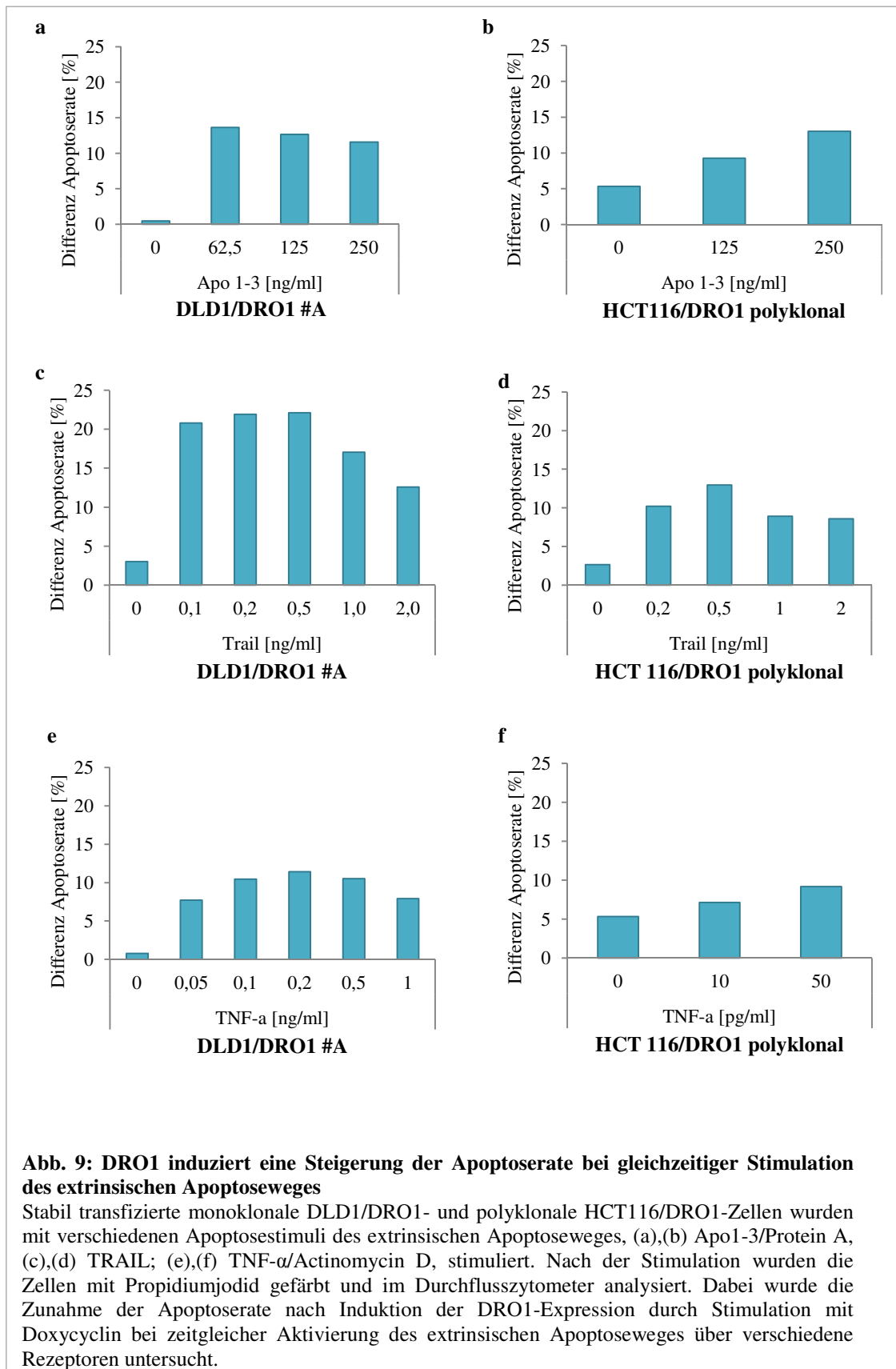
sind. Neben DLD1/ DRO1 #A kam es auch bei DLD1/DRO1 #C und DLD1/DRO1 #I nach Stimulation mit Apo1-3 und gleichzeitiger Expression von DRO1 zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate um mehr als 10% (siehe Abb. 8a).





Wie in Abb. 9a und b dargestellt, kam es bei den polyklonalen HCT116/DRO1-Zellen und den monoklonalen DLD1/DRO1 #A-Zellen nach induzierbarer Re-Expression von DRO1 durch Doxycyclin nach der Stimulation mit Apo1-3 zu einer Steigerung der Apoptoserate um mindestens 10%.

Um zu untersuchen, ob DRO1 neben dem Fas/CD95-Rezeptor auch über weitere Todesrezeptoren einen Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Apoptose nimmt, wurden polyklonale HCT116/DRO1- und DLD1/DRO1 #A-Zellen mit TRAIL stimuliert und im Durchflusszytometer analysiert. In beiden Zelllinien, polyklonalen HCT116/DRO1 und DLD1/DRO1 #A, führte die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Doxycyclin und TRAIL zu einer Zunahme der Apoptoserate um zum Teil mehr als 10%, im Vergleich zu den nur mit TRAIL behandelten Zellen (siehe Abb. 9c und d). Der Effekt ließ sich auch bei den monoklonalen DLD1/DRO1-Klonen #C und #I nachweisen (siehe Abb. 8b).



Zur Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges über einen dritten Todesrezeptor wurde **TNF- α** , ein prototypischer Ligand der TNF-Familie, der an die TNF-Rezeptoren 1 und 2 bindet, gewählt. Dabei konnte sowohl bei der polyklonalen Zelllinie HCT116/DRO1, als auch DLD1/DRO1#A-Zellen in den Messungen am Durchflusszytometer bei DRO1-exprimierenden Zellen eine Zunahme der Apoptoserate nach Stimulation mit TNF- α um etwa 10% beobachtet werden, wie in Abb. 9e und f dargestellt ist. Bei alleiniger Stimulation mit Actinomycin D konnte der Effekt von DRO1 nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Versuche mit den polyklonalen HCT116/DRO1- und den monoklonalen DLD1/DRO1 #A-Zellen zur Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges über den Fas/CD95- und den DR4/5-Rezeptor wurden durch die Untersuchung von weiteren monoklonalen DLD1/DRO1-Zelllinien ergänzt (siehe Abb. 8). Aufgrund der deutlichen Ergebnisse und dem identischen Verhalten der einzelnen monoklonalen DLD1/DRO1-Zelllinien wurde bei den Versuchen mit TNF- α auf eine zusätzliche Stimulation weiterer monoklonaler Zelllinien verzichtet.

Zusammenfassend ist bei Expression von DRO1 nach Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges über alle drei untersuchten Rezeptoren, dem Fas/CD95-Rezeptor, dem TRAIL-Rezeptor (DR4/5) und dem TNF-Rezeptor 1, bei polyklonalen HCT116/DRO1-Zellen und monoklonalen DLD1/DRO1-Zellen eine signifikante Zunahme der Apoptoserate, verglichen mit Zellen, die DRO1 nicht exprimieren, zu beobachten.

Um die Befunde zu bestätigen, wurde als weiteres Verfahren zur Messung der Apoptose das sogenannte Hoechst-Staining angewendet. Dazu wurden polyklonale HCT116/DRO1-Zellen und, exemplarisch für die Zelllinie DLD1/DRO1, DLD1/DRO1 #A-Zellen mit den oben beschriebenen Apoptosestimuli Apo1-3, TRAIL und TNF- α behandelt und mit Hoechst 33342 angefärbt. Die apoptotischen Zellen zeichneten sich bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop durch eine deutlich veränderte Morphologie des Nukleus aus, der nicht mehr, wie bei Zellen in anderen Phasen des Zellzyklus, rund und homogen gefärbt, sondern in mehrere kleine Teile zersetzt ist (siehe Abb. 10 und 11). Dies lässt sich durch den Abbau und die damit verbundene Kondensierung des Chromatins während der Apoptose erklären. Zudem zeigten die apoptotischen Zellen im Vergleich zu den intakten Zellen ein stärkeres Signal für Hoechst 33342.

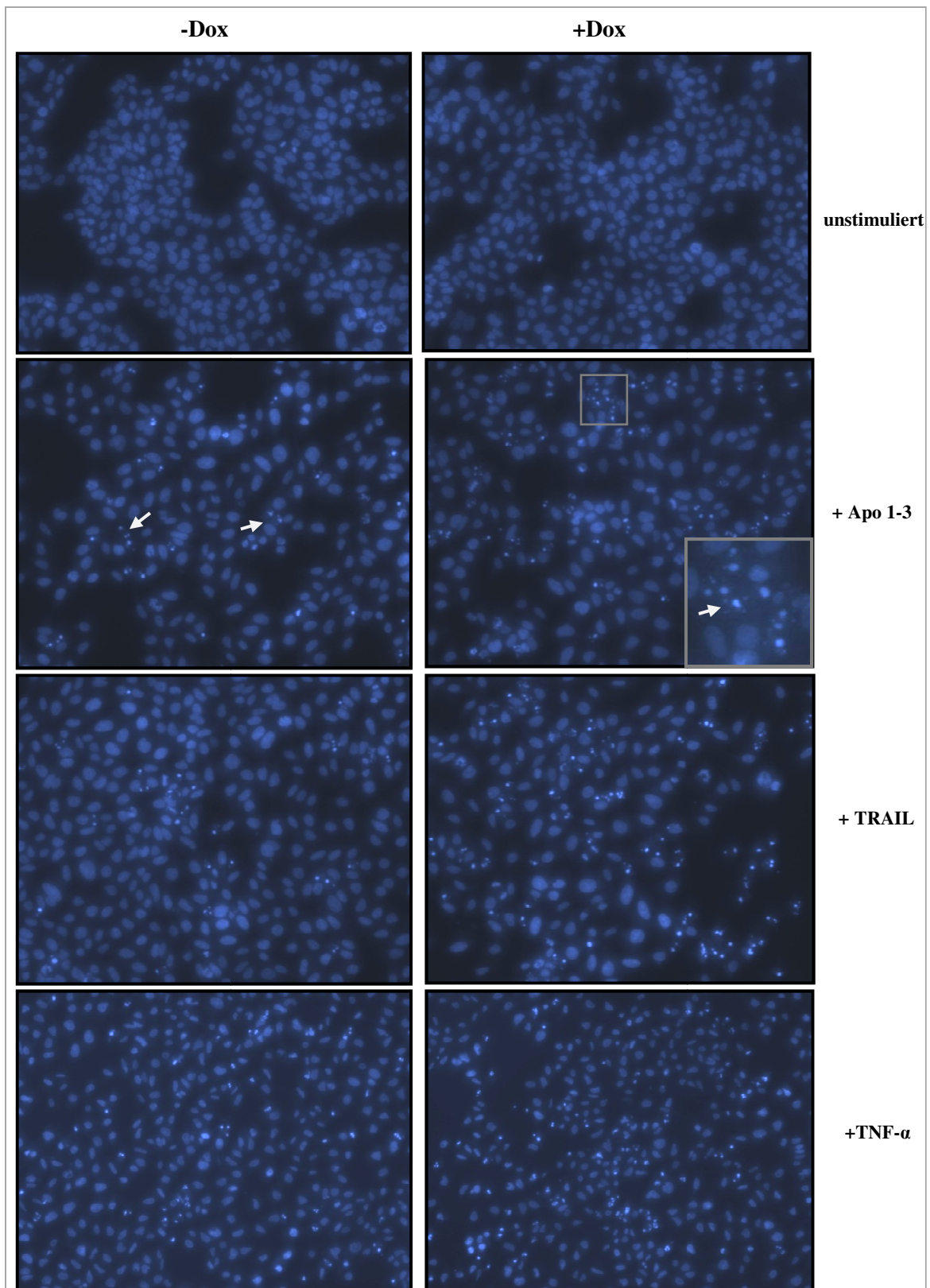


Abb. 10: Anstieg der Apoptoserate durch DRO1- Expression bei DLD1/DRO1 #A –Zellen (Hoechst-Staining)

DLD1/DRO1 # A-Zellen wurden mit Apoptosestimuli des extrinsischen Apoptoseweges stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit Doxycyclin stimuliert, um die DRO1- Expression zu induzieren. Die Zellen wurden mit Hoechst 33342 angefärbt und der Anteil der apoptotischen Zellen im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die apoptotischen Zellen enthalten verändertes Chromatin, das sich heller anfärbt; siehe Pfeile.

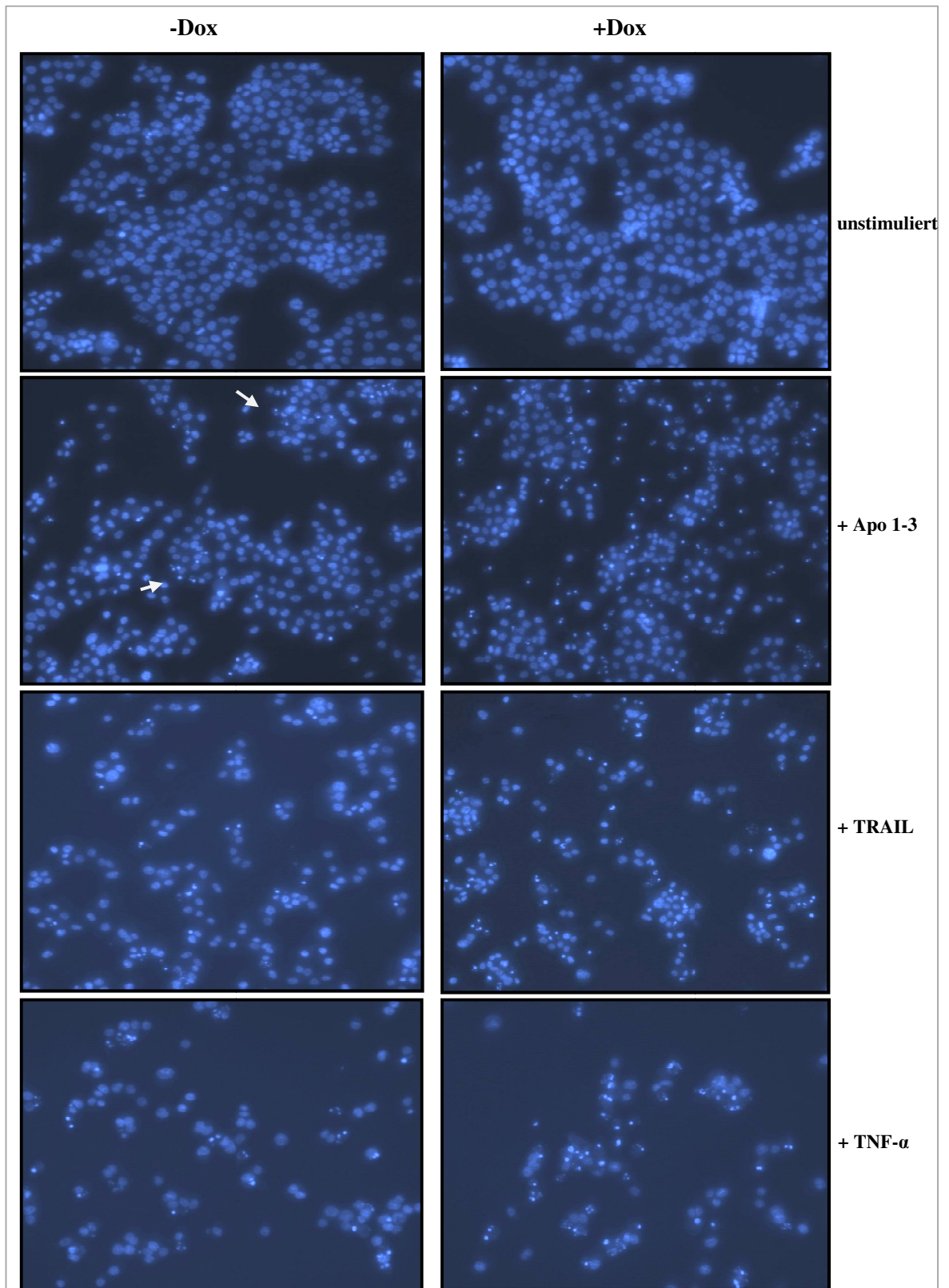
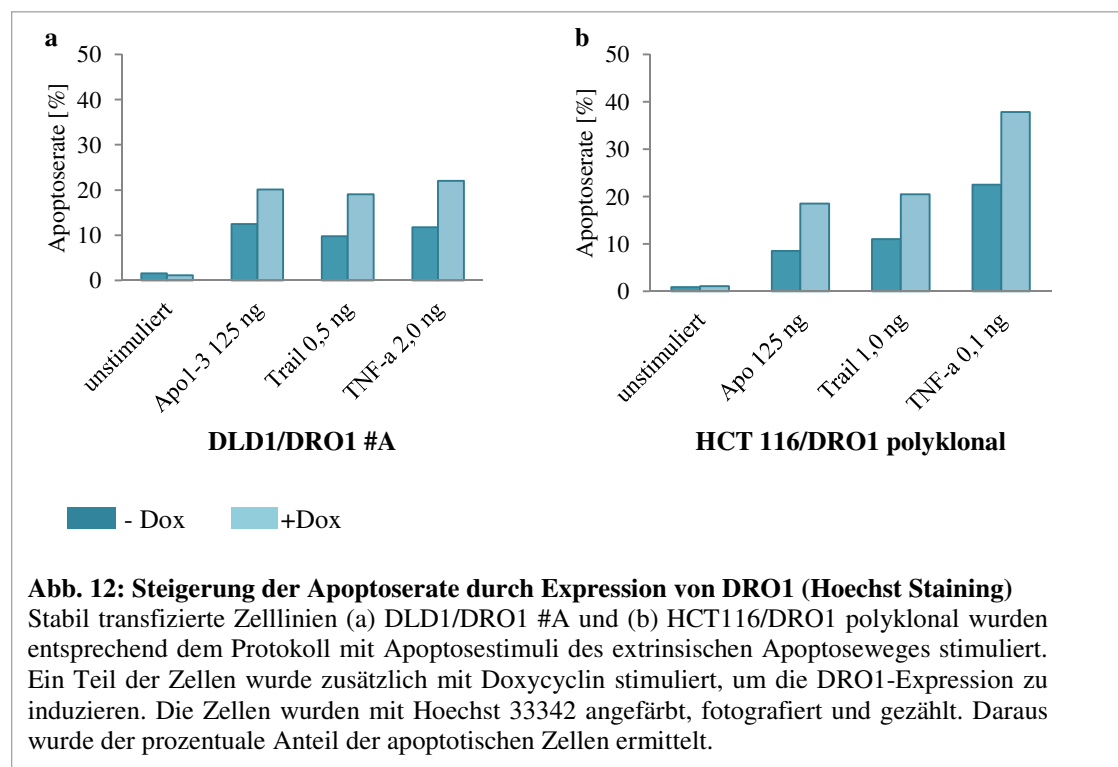


Abb. 11: Anstieg der Apoptoserate durch DRO1-Expression bei polyklonalen HCT116/DRO1-Zellen (Hoechst Staining)

Polyklonale HCT116/DRO1-Zellen wurden mit Apoptosestimuli des extrinsischen Apoptoseweges stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit Doxycyclin stimuliert, um die DRO1-Expression zu induzieren. Die Zellen wurden mit Hoechst 33342 angefärbt und anschließend der Anteil der apoptotischen Zellen im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die apoptotischen Zellen enthalten verändertes Chromatin, das sich heller anfärbt (s. Pfeile).

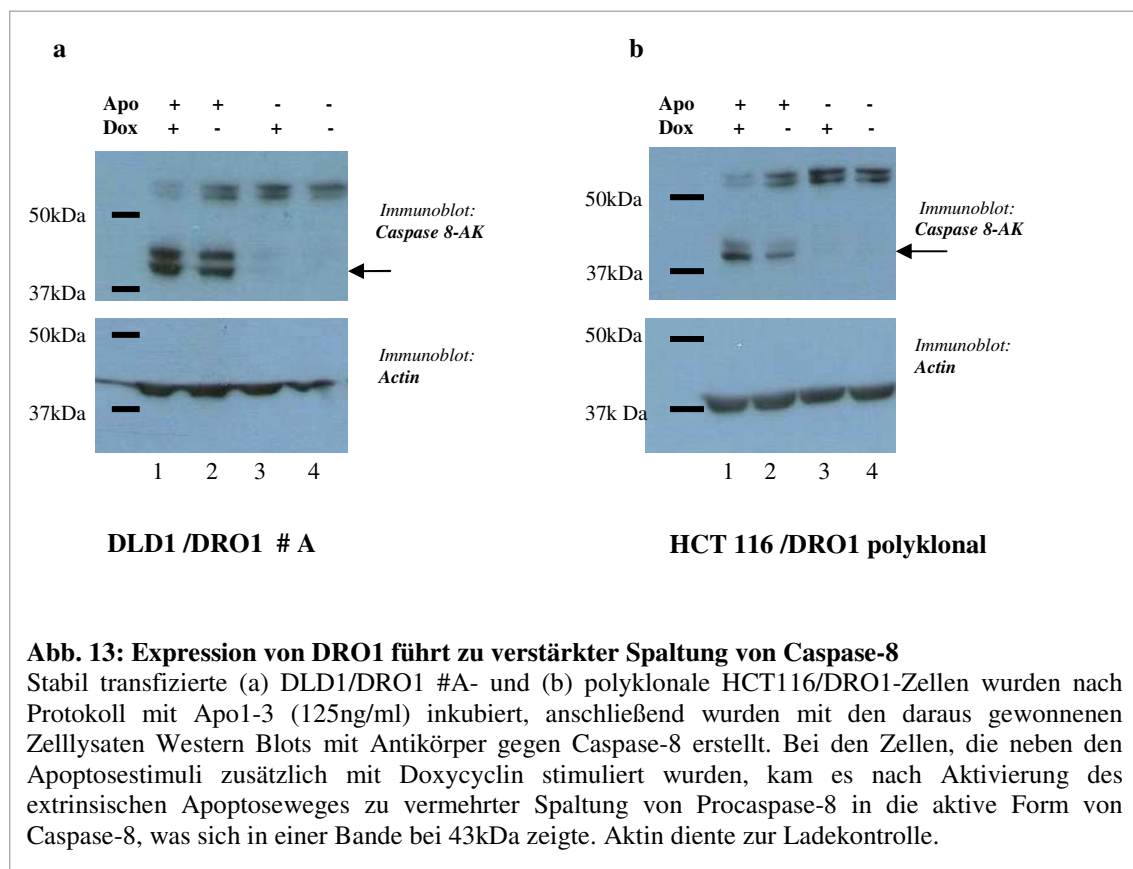
Wie bereits in der Durchflusszytometrie war auch nach Hoechst-Staining bei beiden Zellreihen für jede der Apoptose-stimulierenden Substanzen eine deutliche Zunahme der Apoptoserate bei den DRO1-exprimierenden Zellen um mindestens 10% zu beobachten (siehe Abb.12). Bei diesem Versuch liegen die Apoptoseraten deutlich unter denen der Durchflusszytometrie, was sich dadurch erklären lässt, dass aus methodischen Gründen beim Hoechst-Staining das Medium, in dem apoptotische Zellen schwimmen, abgesaugt werden muss und damit ein Teil der toten Zellen nicht in die Messung mit eingehen kann.



Um nachzuweisen, dass die gezeigten Effekte auf die Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges zurückzuführen sind, wurde die Expression von Caspase-8 in den Zellen mittels Immundetektion im Western Blot analysiert. Caspase-8 liegt in einer inaktiven 57kDa großen Variante und einer aktiven 43kDa großen Form vor. Die Behandlung der Zellen mit Apo1-3, TRAIL oder TNF- α bei gleichzeitiger Expression von DRO1 führt aufgrund der apoptotischen Vorgänge zu einer verstärkten Umwandlung von Caspase 8 in ihre aktive Form. Wie in Abb. 13 (Bande 1 und 2) dargestellt, zeigt sich bei polyklonalen HCT116/DRO1- und monoklonalen DLD1/DRO1 #A- Zellen nach Stimulation mit

Apo1-3 bei gleichzeitiger Expression von DRO1 ein stärkeres Signal bei 43kDa, als bei den Zellen, die DRO1 nicht exprimieren. In diesen Zellen liegt Caspase-8 vermehrt in seiner aktiven Form vor.

Die Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges führt durch Bindung an die Todesrezeptoren zum Beginn einer Kaskade, die in der Umwandlung von Caspase-8 in die aktive Form endet. Da die beschriebene Kaskade sowohl über den Fas/CD95-Rezeptor, als auch über den DR4/5- und den TNF-Rezeptor induziert wird, wurde die Immundetektion für Caspase-8 nur nach Stimulation mit Apo1-3 durchgeführt. In den vorangegangenen Versuchen am Durchflusszytometer konnte bereits gezeigt werden, dass wie bei Apo1-3 auch nach Stimulation mit TRAIL und TNF- α bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Doxycyclin ein Anstieg der Apoptoserate zu beobachten ist. Daher wäre auch nach Stimulation mit TRAIL und TNF- α in der Immundetektion für Caspase-8 ein vergleichbares Ergebnis zu erwarten.



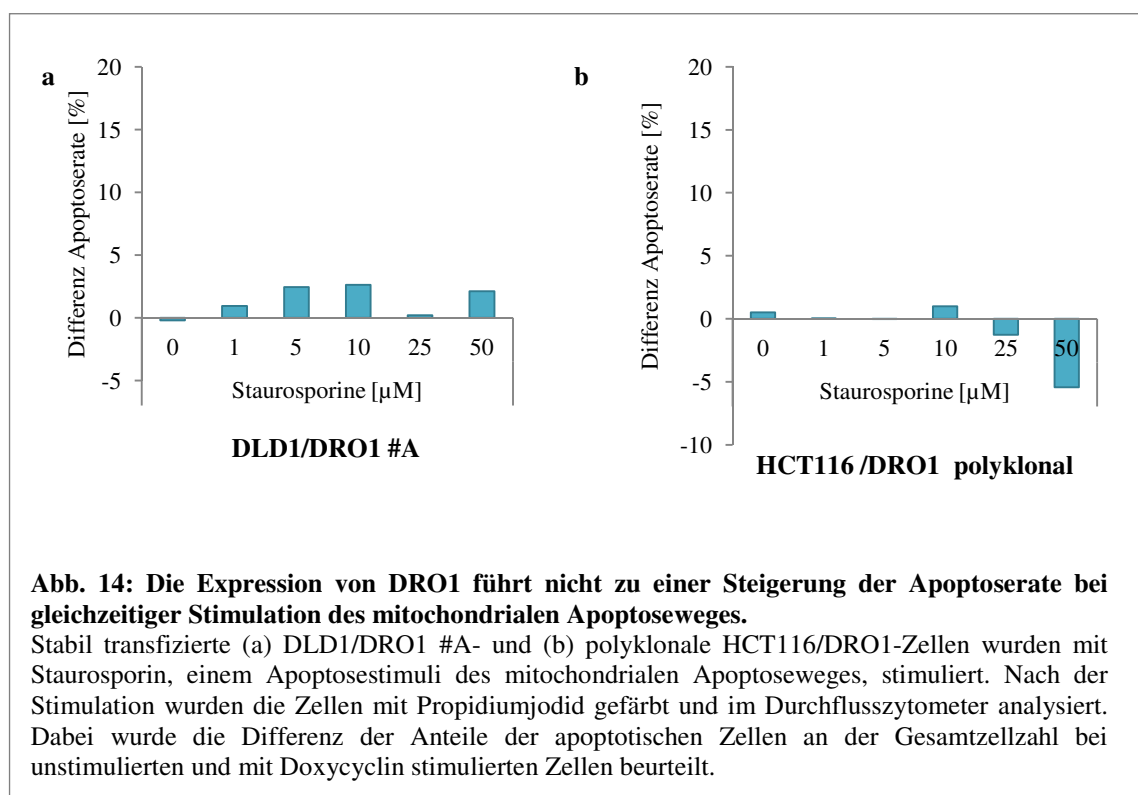
3. DRO1 hat keinen Effekt auf den intrinsischen Apoptoseweg

Das potenzielle Tumorsuppressorgen DRO1 zeigt einen Effekt auf den extrinsischen Apoptoseweg, der über die Aktivierung membranständiger Todesrezeptoren ausgelöst wird und führt dort zu einer Steigerung der Apoptoserate. Dies wirft die Frage auf, ob die Aktivierung von DRO1 auch andere Apoptosewege, wie den intrinsischen oder mitochondrialen Weg, beeinflusst.

Zur Stimulation des intrinsischen Apoptoseweges wurde die Substanz Staurosporin verwendet [82-83].

DLD1/DRO1 #A- und polyklonale HCT116/DRO1- Zellen wurden mit Staurosporin stimuliert und anschließend zur Untersuchung der Zellzyklusverteilung im Durchflusszytometer analysiert. Im Gegensatz zur Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges konnte bei beiden Zellreihen kein signifikanter Anstieg der subG1-Phase bei DRO1 exprimierenden Zellen beobachtet werden, wie in Abb. 14 dargestellt.

Aufgrund des fehlenden Effektes wurde im Folgenden von der Stimulation weiterer monoklonaler Zellreihen mit Staurosporin abgesehen.



4. DRO1 hat keinen Effekt auf den ER-Stress-vermittelten Apoptoseweg

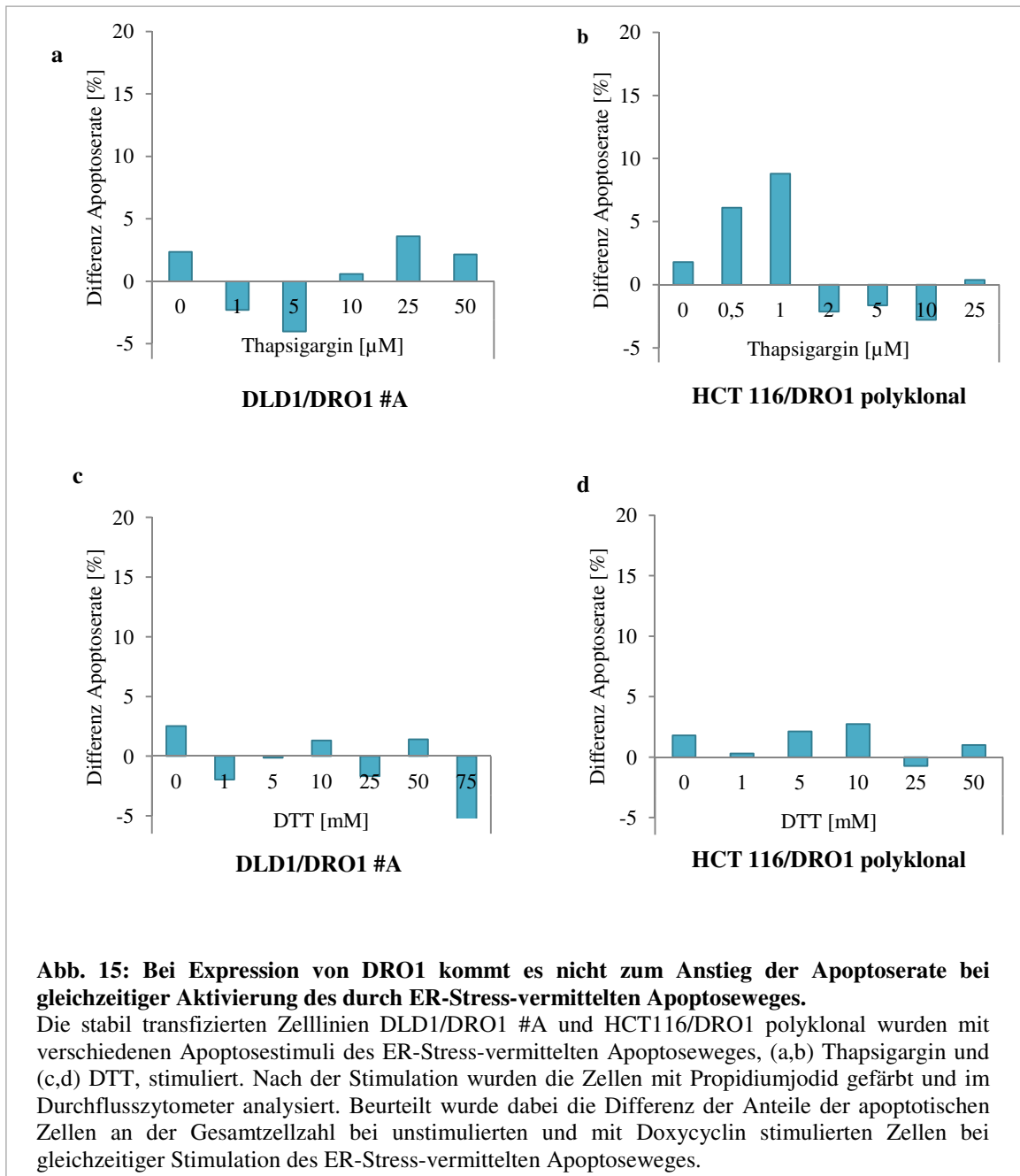
Aus jüngeren Untersuchungen ist neben den erwähnten Signalwegen ein dritter Apoptoseweg bekannt, der durch Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum und am Golgi-Apparat ausgelöst wird. Zur Stimulation dieses Apoptoseweges wurden Thapsigargin und DL-Dithiothreitol (DTT) ausgewählt.

Zunächst wurden die Zellen mit Thapsigargin, einem spezifischen Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase im sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulum, behandelt.

Nach der Stimulation mit Doxycyclin zur Induktion der Expression von DRO1 wurden die Zellen mit Thapsigargin stimuliert und im Durchflusszytometer analysiert. Anders als beim extrinsischen Apoptoseweg konnte bei den Analysen im Durchflusszytometer sowohl mit DLD1/DRO1 #A- Zellen, als auch bei polyklonalen HCT116/DRO1- Zellen kein Apoptose-verstärkender Effekt beobachtet werden. Die Apoptoserate stieg nach Stimulation mit Thapsigargin und gleichzeitiger Expression von DRO1 verglichen mit den Zellen, die nur mit dem Apoptosestimuli behandelt worden waren, nicht an. (siehe Abb. 15a und b).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde als weitere Apoptose-stimulierende Substanz DL-Dithiothreitol (DTT) ausgewählt. Die DLD1/DRO1 #A- und polyklonalen HCT116/DRO1- Zellen wurden mit DTT stimuliert und ebenfalls im Durchflusszytometer untersucht. Auch bei diesem Apoptosestimulus konnte sich kein verstärkender Effekt von DRO1 auf den ER-Stress-vermittelten Apoptoseweg nachweisen lassen, da es bei den Zellen mit aktivierter DRO1 –Expression nicht zu einer signifikanten Steigerung der subG1-Phase kam (siehe Abb. 15 c und d).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DRO1 auf den ER-Stress-vermittelten Apoptoseweg keinen verstärkenden Effekt zu haben scheint.



IV) DISKUSSION

DRO1 und das kolorektale Karzinom

Bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen spielt in über 80% der Fälle die Inaktivierung von APC und die damit verbundene Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalweges eine bedeutende Rolle [11, 93-95]. Durch die Veränderungen des Wnt-Signalweges werden verschiedene Gene verstärkt exprimiert, wie beispielsweise c-MYC [14], während bisher nur wenige Gene sind bekannt, deren Expression durch die Stabilisierung des Wnt-Signalweges vermindert wird. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Tumorsuppressorgen-Kandidat DRO1.

DRO1-Expression in kolorektalen Karzinomzelllinien

DRO1 wird in Karzinomzellen von Darm und Pankreas nur in stark reduziertem Maße exprimiert. Um die Eigenschaften dieses Gens charakterisieren zu können, wurden verschiedene kolorektale Tumorzelllinien, u.a. HCT116 und DLD1, stabil mit einem induzierbaren Expressionvektor für DRO1 transfiziert [88]. So konnten polyklonale Zelllinien etabliert werden, die DRO1 induzierbar exprimieren. Verglichen mit den vorangegangenen Untersuchung zu DRO1 von Bommer et al. [11], bei denen mit Zellen gearbeitet wurde, die DRO1 konstitutiv exprimierten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein induzierbares Vektorsystem verwendet. Mit diesem Vorgehen sollte eine über längeren Zeitraum stabile DRO1-Expression erreicht werden.

Die DRO1-Expression in den einzelnen Zellen in diesen polyklonalen Zelllinien war unterschiedlich stark. Im Verlauf der Experimente wurde deutlich, dass eine längere Kultivierungsdauer der Zellen zu einer Abnahme der DRO1-Expression führte. Die Vermutung liegt nahe, dass DRO1 in den polyklonalen Zelllinien nicht von allen Zellen gleichmäßig stark exprimiert wird und die Zellen mit geringerer DRO1-Expression einen Selektionsvorteil jenen gegenüber aufweisen, welche DRO1 in höherem Maße exprimieren. Aufgrund der eingeschränkten Sensitivierung für Apoptose der Zellen mit geringerer DRO1-Expression zeigen diese Zellen einen Überlebensvorteil, wodurch sich im Verlauf eine Zellpopulation entwickelt kann, deren DRO1-Expression kontinuierlich abnimmt.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit aus polyklonalen Zelllinien monoklonale Zelllinien etabliert, die DRO1 in stabiler Form induzierbar exprimieren können. Aus ausgewählten polyklonalen DLD1/DRO1-Zellen konnten mehrere DLD1/DRO1-

Monoklone gewonnen werden, die DRO1 sehr gut exprimierten (siehe Abb.6). Für die anschließenden Versuche wurde eine der monoklonalen Zelllinien ausgewählt. Die Expression von DRO1 in den monoklonalen Zelllinien ist konstanter, wodurch die Ergebnisse aussagekräftiger werden. Aufgrund der Eigenschaften des Expressionsvektors ist nach längerer Kultivierungszeit eine geringe Abnahme der Induzierbarkeit von DRO1 anzunehmen [88].

Bedauerlicherweise gelang es nicht, monoklonale HCT116/DRO1- Klone zu etablieren, die DRO1 über einen längeren Zeitraum konstant exprimierten, wie die monoklonalen DLD1/DRO1-Klone. Bereits nach sehr kurzer Zeit in der Zellkultur ging die DRO1-Expression deutlich zurück, die durchgeführten Untersuchungen erbrachten widersprüchliche Ergebnisse. Anders verhielten sich die polyklonalen Klone. Hier konnten konstante Ergebnisse erzielt werden.

Die Funktion von DRO1

In den bisherigen Untersuchungen wurde beschrieben, dass DRO1 eine Funktion im Ablauf apoptotischer Vorgänge in Tumorzellen aufweist. Bei der ektopen Re-Expression von DRO1 in Karzinomzellen von Darm und Pankreas konnte die Hemmung von malignem Wachstum, im Sinne einer Wachstumshemmung der Zellkolonien in sogenannten *Colony Forming Assays* und auch die Hemmung von „*anchorage independent growth*“, Wachstum von Zellen ohne direkten Kontakt zu Nachbarzellen, beobachtet werden [11]. Des Weiteren hatte sich gezeigt, dass DRO1 Tumorzellen für Anoikis, eine Form von Apoptose, die induziert wird, wenn sich Zellen von ihrem Zellverband und damit von der extrazellulären Matrix der Nachbarzellen lösen, sensitivieren kann [11]. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der Tatsache, dass das Gen in Karzinomen herunter reguliert ist, kann man vermuten, dass es sich bei DRO1 um ein Tumorsuppressorgen handelt.

Unter standardisierten adhärennten Zellkulturbedingungen hatte die Re-Expression von DRO1 keine Auswirkungen auf den Zellzyklus und auf die Proliferation der Tumorzellen [11]. Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Auch in den hier durchgeführten Versuchen, die u.a. Messungen der Zellzyklusverteilung betrafen, konnte keine signifikante Veränderung des Zellzyklus durch die Expression von DRO1 nachgewiesen werden.

DRO1 sensitiviert Tumorzellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose

Bommer et al. zeigten, dass in konstitutiv DRO1-exprimierenden Zellen neben einer Sensitivierung der Zellen für Anoikis bei Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges mit einem Fas-Liganden (Apo1-3) auch eine Sensitivierung der Tumorzellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose beobachtet werden konnte. [11]. In der vorliegenden Arbeit gelang es, dieses Ergebnis an Kolonkarzinomzelllinien, die DRO1 induzierbar exprimierten, zu reproduzieren. Bei gleichzeitiger Stimulation mit dem Fas-Liganden konnte bei DRO1-exprimierenden Zellen ein Anstieg der Apoptoserate um etwa 10 % beobachtet werden. DRO1 sensitiviert damit die kolorektalen Karzinomzellen für den extrinsischen Apoptoseweg, der über den Fas-Rezeptor aktiviert wird.

Neben dem Fas/CD95-Rezeptor liegen weitere Rezeptoren in der Zellmembran, über die durch Bindung entsprechender Liganden der extrinsische Apoptoseweg induziert werden kann, wie beispielsweise der TNF-Rezeptor TNFR1 oder die TRAIL-Rezeptoren DR4/5 [77-78]. Im Hinblick auf die Ergebnisse mit dem Fas-Liganden wurde untersucht, ob die Expression von DRO1 auch bei der Induktion von Apoptose über einen weiteren dieser Todesrezeptoren einen Effekt zeigt. Bei den Analysen des Zellzyklus ließen sich auch nach Stimulation mit DR4/5- und TNFR1-Liganden durch die Sensitivierung der Zellen durch DRO1 Steigerungen der Apoptoseraten um mindestens 10% nachweisen. Damit sensitiviert das potenzielle Tumorsuppressorgen DRO1 kolorektale Tumorzellen für den Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg. Dies geschieht sowohl nach Ligation an den Fas-Rezeptor, als auch durch Aktivierung der Todesrezeptoren TNFR1 und DR4/5.

Apoptose kann darüber hinaus auch unabhängig von den bekannten Apoptosewegen induziert werden, wie es beispielsweise für *drs* (*downregulated by v-src*) gezeigt wurde, das die Caspasen-12, -9 und -3 ohne die Beteiligung von Cytochrom c oder p53 aktiviert [97]. Um die Sensitivierung für Apoptose durch den Effekt von DRO1 als Folge der Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges zu beweisen, wurden Western Blots mit Immundetektion zum Nachweis von Caspase-8, dem Schlüsselenzym des extrinsischen Apoptoseweges, durchgeführt.

Es zeigte sich, wie aufgrund der vorangegangenen Versuche zu erwarten, in beiden Zelllinien, polyklonale HCT116/DRO1 und DLD1/DRO1 #A, ein verstärktes Signal für Caspase-8 bei jenen Zellen, die durch zusätzliche Stimulation mit Doxycyclin DRO1 exprimierten, als im Vergleich zu denen, die nur mit dem jeweiligen Apoptosestimulus behandelt worden waren. Damit gelang der Nachweis, dass der Apoptose-verstärkende

Effekt von DRO1 auf die Auswirkungen auf den extrinsischen Apoptoseweg zurückzuführen ist.

DRO1 zeigt keinen sensitivierenden Effekt auf den intrinsischen und den durch ER-Stress-vermittelten Apoptoseweg

Darauf aufbauend stellt sich die Frage, ob DRO1 neben dem extrinsischen Apoptoseweg auch Einfluss auf weitere Apoptosewege nimmt, wie beispielsweise den intrinsischen oder mitochondrialen Apoptoseweg. Dieser Apoptoseweg wird vorwiegend durch intrazelluläre Stimuli, wie Zellstress oder DNA-Veränderungen aktiviert.

Um die Auswirkungen von DRO1 auf diesen Apoptoseweg zu untersuchen, wurden Experimente mit Staurosporin, einem Stimulus des intrinsischen Apoptoseweg, durchgeführt. Verglichen mit dem Effekt auf den extrinsischen Apoptoseweg konnte bei Stimulation des intrinsischen Weges kein Apoptose-sensitivierender Effekt von DRO1 beobachtet werden: Es kam zu keinem signifikanten Anstieg der Apoptoserate. Damit kann festgestellt werden, dass DRO1 offenbar keinen sensitivierenden Effekt auf den intrinsischen Apoptoseweg hat.

Neben den beschriebenen Apoptosewegen wurde ein dritter Apoptoseweg betrachtet, der durch Veränderungen im Bereich des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) vermittelt wird. Als Folge von sogenanntem ER-Stress, der beispielsweise durch verändertes Ca^{2+} -Gleichgewicht im Endoplasmatischen Retikulum oder Fehler in der posttranslationalen Glykosylierung von Proteinen verursacht wird, werden Caspase-12 und -2 aktiviert, was zur Spaltung und damit Aktivierung von Caspase-9 führt, wodurch die Effektorcaspase-3 aktiviert wird [40-41].

Zur Untersuchung des Effektes von DRO1 auf diesen Apoptoseweg wurden die kolorektalen Tumorzelllinien mit Substanzen, die ER-Stress induzieren, stimuliert. Auch hier konnte in keiner der untersuchten Zelllinien eine Sensitivierung der kolorektalen Karzinomzellen durch den Tumorsuppressorgenkandidaten DRO1 nachgewiesen werden. DRO1 hat damit keinen sensitivierenden Effekt auf den durch ER-Stress vermittelten Apoptoseweg. Dieser Aspekt ist besonders bemerkenswert, da *drs* (*down-regulated by v-src*), dessen C-terminal gelegene Domäne große strukturelle Ähnlichkeit mit den Repeat-Abschnitten von DRO1 aufweist, durch Interaktion mit einem pro-apoptotisch wirkenden Protein des ER, ASY/Nogo-B/RTN-x_s, Apoptose über das Endoplasmatische Retikulum

induzieren kann [64, 97]. Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten in den Aminosäuresequenzen würde man hier auch Parallelen in der Funktion und einen Effekt von DRO1 auf diesen Apoptoseweg vermuten.

Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass DRO1 kolorektale Karzinomzellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose sensitiviert, speziell für den Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg, der durch die Stimulation von membranständigen Todesrezeptoren (Fas/CD95-, TRAIL(DR4 und -5)- und des TNF-Rezeptor1) aktiviert wird und dabei offensichtlich keinen Einfluss auf den intrinsischen Apoptoseweg über die Mitochondrien nimmt. Desweiteren scheint DRO1, entgegen den Erwartungen aus den Forschungen zu *drs*, auch keinen Effekt auf den Apoptoseweg zu haben, welcher durch Veränderungen im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat induziert wird.

Drs (down-regulated by src)

Bei der Untersuchung des strukturellen Aufbaus von DRO1 fällt auf, dass die Repeat-Domänen von DRO1 jeweils zu 30% mit dem C-terminalen Abschnitt des Tumorsuppressorgenkandidaten *drs* (*down-regulated by src*) identisch sind [11]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten könnte man auch funktionelle Parallelen vermuten.

Dies zeigt sich bereits in der Expression der Gene. Eine Expression der humanen Form von *drs* konnte in vielen Organen nachgewiesen werden, war in Karzinomzellen des Kolons, der Blase, der Prostata, des Ovar, der Lunge und nach neueren Erkenntnissen auch beim adulten T-Zell-Lymphom jedoch stark vermindert [61, 98-102]. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die verminderte Expression von *drs* in der Entstehung und im Fortschreiten dieser Karzinome eine entscheidende Rolle spielt [101]. Im Vergleich dazu war in Kolon – und Pankreaskarzinomzellen ebenso eine verminderte DRO1-Expression zu beobachten [11].

Eine weitere Funktion von *drs* ist, das „anchorage independent growth“, das Wachstum der Zellen, wenn sie sich aus ihrer extrazellulären Matrix lösen, zu hemmen und so möglicherweise an entscheidender Stelle der Karzinogenese diese aktiv zu supprimieren. Dabei spielen sowohl die N-terminal gelegenen Sushi-Motive als auch das C-terminal gelegene Ende in der Transmembrandomäne für diese Funktion eine

bedeutende Rolle [62]. *Drs* scheint aus diesen Gründen an der Unterdrückung malignen Wachstums in verschiedenen Organen beteiligt zu sein [97].

Wie DRO1 führt *drs* bei Re-Expression zu einer verstärkten Apoptosereaktion in humanen Tumorzellen. Dies geschieht jedoch über verschiedene Mechanismen. An der Induktion von Apoptose unter dem Einfluss von *drs* sind sowohl der C-terminale Abschnitt als auch die Sushi-Motive des *drs*-Proteins beteiligt und stellen damit funktionell wichtige Bereiche dar. *Drs* aktiviert Caspase-12, -9 und -3, ohne dass dabei der mitochondriale Apoptoseweg oder p53 tangiert werden [97], es kommt nicht zu einem Anstieg von Cytochrom c, wie dies für den intrinsischen Apoptoseweg üblich ist. Auch die Rezeptor-vermittelte Apoptose, bei der es zur Aktivierung von Caspase-8 kommt, ist nicht in die apoptotischen Vorgänge von *drs* involviert [97].

Stattdessen interagiert *drs* mit ASY/NogoB/RTN- α _S, einem pro-apoptotisch wirkenden Protein, das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Dadurch werden Caspase-12, -9 und -3 direkt aktiviert und induzieren in der Zelle Apoptose [64, 97]. Die Tatsache, dass *drs* in diesen Apoptosesignalweg eingebunden ist, unterstützt die These, dass *drs* in der Suppression von Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielen könnte [97]. Während *drs* über diesen Signalweg Apoptose induziert und dabei weder der extrinsische noch der intrinsischen Apoptoseweg aktiviert werden [64, 97], konnte im Gegensatz dazu in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass DRO1 die Tumorzellen für den Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg sensitiviert. Der intrinsische Apoptoseweg scheint bei keinem der beiden Gene in das apoptotische Geschehen eingebunden zu sein. Möglicherweise erfolgt die Bindung von *drs* an ASY/NogoB/RTN- α _S, die dann zur Induktion von Apoptose führt, über Bindungsstellen, die außerhalb der zu DRO1 homologen Region liegen.

Vergleich von DRO1 zu den bisherigen Untersuchungen zu Urb, CL2, Ccdc80 und Equarin im Hinblick auf Apoptose

Neben der strukturellen Ähnlichkeit mit *drs* liegt eine Homologie zur Sequenz des *Equarin*-Gens des Huhns, das eine Rolle in der Embryonalentwicklung des Auges von Hühnern zu spielen scheint, vor [65]. Nach derzeitigem Stand der Forschung sind auf funktioneller Ebene keine Gemeinsamkeiten mit DRO1 bekannt [11]. Ein Einfluss von Equarin auf apoptotische Vorgänge in der Zelle ist bislang nicht erforscht.

Bei der Analyse von Gendatenbanken fallen weitere Gene auf, die zu DRO1 homolog sind, jedoch bei verschiedenen Lebewesen entdeckt wurden. Das **Urb** (*up-regulated in bombesin receptor subtype (BRS) 3 deficient mice*)-Gen der Maus, das **CL2-Gen** der Ratte und **Ccdc80** (*coiled-coil domain containing 80*) des Menschen entsprechen dem humanen Gen DRO1 [66-68].

In der Zusammenschau der verschiedenen Untersuchungsergebnisse scheint das Gen vielfältige Funktionen zu besitzen. Im Hinblick auf den Einfluss auf apoptotische Vorgänge der Zelle haben sich bislang jedoch verschiedene Gesichtspunkte ergeben.

Bei gesunden Mäusen wurde das Gen im Fettgewebe entdeckt [66, 70]. Es scheint eine Rolle im Fettstoffwechsel und im Energiehaushalt zu spielen [69]. Desweiteren werden ihm Funktionen in der Entwicklung des Knorpelanteils des Skeletts zugeschrieben [70].

Auch im Fettgewebe des Menschen konnte das Gen nachgewiesen werden. Hier wurde es nach dem Gennamen mit „Ccdc80“ bezeichnet. Ccdc80 wird zum einen eine wichtige Funktion in der Entstehung und Differenzierung von Adipozyten zugeschrieben [67]. Zum anderen beeinflusst das Gen Komponenten des Wnt-/ β -Catenin-Signalweges, wie Wnt-Proteine oder deren Rezeptoren, und reguliert die TCF-vermittelte Transkription über Signalwege auch unabhängig vom Wnt-/ β -Catenin-Signalweg [67]. Dadurch können Regulatoren der Adipogenese, wie z.B. PPAR γ , die bei Aktivierung des Wnt-Signalweges gehemmt werden, induziert und aktiviert werden [67].

Der Wnt-/ β -Catenin-Signalweg spielt eine entscheidende und wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung vieler Gewebe und Zellen. In den Untersuchungen zu Ccdc80 wurde die Bedeutung des Signalweges und dessen Zielgene für die Adipogenese deutlich gemacht [67].

Die Aktivierung des Wnt-Signalweges ist ein entscheidender Schritt auch in der kolorektalen Karzinogenese. In der Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu DRO1 und der Arbeit zu Ccdc80 könnte vermutet werden, dass das Gen nicht nur in Bezug auf die Adipogenese Einfluss auf den Wnt-Signalweg hat. Der Wnt-Signalweg induziert u.a. auch die Zellproliferation und kann so zur Entstehung von malignen Tumoren führen. Die Expression von DRO1 in Tumorgewebe wird durch die Aktivierung von β -Catenin letztlich herunter reguliert. Möglicherweise gibt es jedoch weitere Mechanismen, die umgekehrt zu einer Hemmung von Komponenten des Wnt-Signalweges durch die Expression von DRO1 führen und so Einfluss auf apoptotische Vorgänge in der Zelle haben könnten. Es wäre denkbar, dass bei Expression von DRO1 der extrinsische Apoptoseweg durch eine hemmende Wirkung auf den Wnt-Signalweg

verstärkt induziert wird. Dazu müssten weiterführende Untersuchungen angeschlossen werden.

DRO1 konnte ebenfalls in Schilddrüsenzellen von Ratten identifiziert werden und wurde dort von Visconti et al. mit „CL2“ benannt [68]. Wie dies bei DRO1 für das kolorektale Karzinom und das Pankreaskarzinom gezeigt wurde [11], wird CL2 in Karzinomzellen der Schilddrüse und des Ovar der Ratte kaum oder gar nicht exprimiert [68]. Auch Visconti et al. vermuten, dass es sich auch bei CL2 um ein mögliches Tumorsuppressorgen handeln könnte, das, neben dem Schilddrüsen- und dem Ovarialkarzinom, auch in der Karzinogenese weiterer Tumoren eine wichtige Rolle spielen könnte [68]. Des Weiteren fiel auf, dass das Gen in normalen, nicht transfizierten PC CL3 Zellen kaum nachweisbar ist, aber in PC Zellen, die mit Adenovirus E1A transfiziert sind, verstärkt exprimiert wird, was bedeutet, dass E1A die Expression des Gens induziert [68]. Man geht davon aus, dass CL2, obwohl es durch das E1A-Gen verstärkt induziert wird, durch pro-apoptische Effekte, die mit E1A in Zusammenhang stehen, in Karzinomen herunter reguliert wird [68]. Es ist bekannt, dass Zellen, die E1A stabil exprimieren, für Apoptosestimuli wie Hypoxie, DNA-Schäden, Fas und TNF- α sensitiviert werden [103]. Das bedeutet, dass DRO1 bzw. CL2 möglicherweise auch über diesen Weg Einfluss auf apoptotische Vorgänge in der Zelle und auf den Ablauf des Zellzyklus haben könnte. Vielleicht führen zu einem Gene, die bisher noch nicht identifiziert wurden, in ihrer Funktion aber E1A ähnlich sind, zur Herabregulierung von DRO1 in Tumorzellen. Zum anderen könnten möglicherweise solche Gene mit E1A-ähnlichen Funktionen zur verstärkten Sensitivierung für Stimuli des extrinsischen Apoptoseweg bei Expression von DRO1 beitragen und so die beschriebenen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit erklärt werden.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass DRO1 zu einer Gemeinsamkeit mit dem Tumorsuppressorgen *drs* hat, das wie DRO1 für verstärkte Induktion von Apoptose in Tumorzellen verantwortlich ist, dies jedoch auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen ist, zum anderen drei homologe Gene bekannt sind. DRO1 bzw. CL2, *Urb* und *Ccdc80* haben Funktionen in der Regulation von Fettgewebe, in der Embryogenese des Skeletts und werden in Karzinomzellen vermindert exprimiert, was die Vermutung bekräftigt, dass es sich bei DRO1 um einen potenziellen Tumorsuppressorgen-Kandidaten handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, monoklonale Zelllinien zu etablieren, die das Gen DRO1, ein potenzielles Tumorsuppressorgen, das in kolorektalen Karzinomen durch die Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalweges vermindert exprimiert wird, stabil induzierbar re-exprimieren zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass DRO1 die Zellen für den extrinsischen Apoptoseweg sensitivieren kann und dass dies über Stimulation des Fas/CD95-, des TRAIL- und des TNFR1-Rezeptors geschieht. An diesem Punkt kommt nun die Frage auf, auf welche Weise und über welche Mechanismen dies vermittelt wird. Welche Signalwege werden genau durch die Re-Expression von DRO1 beeinflusst und führen so zu einer Steigerung der Apoptoserate? Werden beispielsweise Adaptermoleküle wie FADD und TRADD vermehrt an die Todesrezeptoren rekrutiert, oder wird das Signal verstärkt weitergegeben? Hat DRO1 Einfluss auf die Spaltung der Procaspase-8?

Außerdem könnte weiter in die Richtung des endoplasmatischen Retikulums geforscht werden. Nachdem *drs* über einen Mechanismus, der im Zusammenhang mit dieser Zellorganelle steht, unabhängig von den Mitochondrien Apoptose induzieren kann, könnte möglicherweise auch DRO1 über einen solchen Weg wirken zusätzlich zur Rezeptor-vermittelten Apoptose. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bewiesen werden. Hier wurde gezeigt, dass DRO1 keinen Effekt auf den Apoptoseweg hat, der durch ER-Stress induziert wird.

V) ZUSAMMENFASSUNG

Die Pathogenese des kolorektalen Karzinoms wird intensiv erforscht, da es sich um eines der am häufigsten auftretenden Karzinome des Menschen handelt. Eine besonders wichtige und charakteristische Veränderung zu Beginn der Karzinogenese ist dabei die Inaktivierung des APC-Gens und die damit verbundene Aktivierung des Wnt-/ β -Catenin-Signalweges. Viele Onkogene werden durch die veränderten Gegebenheiten verstärkt exprimiert und bewirken so die Entstehung von malignen Tumoren. Nur einige wenige Gene sind bekannt, die in Karzinomen durch den Wnt-/ β -Catenin Signalweg herunter reguliert werden. Eines dieser Gene ist das potenzielle Tumorsuppressorgen DRO1 (*down-regulated by oncogenes1*).

Zur genaueren Charakterisierung von DRO1 wurden kolorektale Karzinomzelllinien stabil mit einem induzierbaren DRO1-Konstrukt transfiziert. Aus polyklonalen DLD1/DRO1-Zellen konnten monoklonale Zelllinien etabliert werden, die DRO1 bei Stimulation mit einem Antibiotikum induzierbar in gleichförmiger Weise exprimieren können, wobei die monoklonalen Zelllinien den polyklonalen Zelllinien in ihrem Verhalten entsprechen.

Desweiteren konnten genauere Erkenntnisse zur Funktion von DRO1 gewonnen werden: DRO1 sensitiviert kolorektale Karzinomzellen für den Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg, der über die Stimulation des Fas/CD95-Rezeptors, des TRAIL-Rezeptors und des TNF-Rezeptors 1 induziert wird. Nach Induktion der Apoptose über diesen Apoptoseweg kommt es durch den sensitivierenden Effekt von DRO1 zu einer erhöhten Apoptoserate. Dieser Effekt konnte jedoch weder für den zweiten wichtigen Apoptoseweg, den mitochondrialen Apoptoseweg, noch für den Apoptoseweg, der durch sog. ER-Stress vermittelt wird, nachgewiesen werden. In beiden Fällen konnte die Expression von DRO1 keinen Apoptose-verstärkenden Effekt erzeugen.

Bemerkenswerterweise führt ein zu DRO1 homologes Protein *drs*, zu einer ER-Stress-vermittelten Apoptose, obwohl es Sequenzähnlichkeiten zu DRO1 aufweist.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass das potenzielle Tumorsuppressorgen DRO1 kolorektale Karzinomzellen spezifisch für den Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg sensitiviert.

VI) ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Die Säulen der Karzinogenese	14
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Apoptosewege	17
Abb. 3: Darstellung der Zellzyklusverteilung am Durchflusszytometer	38
Abb. 4: Stabil transfizierte polyklonale DLD1/DRO1 und HCT116/DRO1 exprimieren induzierbar DRO1	45
Abb. 5: GFP-Expression bei monoklonalen, stabil transfizierten DLD1/DRO1-Zellen	46
Abb. 6: Stabil transfizierte monoklonale DLD1/DRO1- und HCT116-Klone exprimierten induzierbar HA-Epitop-markiertes DRO1	47
Abb. 7: Anstieg der Apoptoserate bei stabil transfizierten Kolonkarzinomzelllinien durch Expression von DRO1	49
Abb. 8: DRO1 induziert eine Zunahme der Apoptoserate in monoklonalen DLD1/DRO1-Zelllinien	50
Abb. 9: DRO1 induziert eine Steigerung der Apoptoserate bei gleichzeitiger Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges	51
Abb. 10: Anstieg der Apoptoserate durch DRO1- Expression bei DLD1/DRO1 #A –Zellen (Hoechst-Staining)	53
Abb. 11: Anstieg der Apoptoserate durch DRO1-Expression bei polyklonalen HCT116/DRO1-Zellen (Hoechst Staining)	54
Abb. 12: Steigerung der Apoptoserate durch Expression von DRO1 (Hoechst Staining) ..	55
Abb. 13: Expression von DRO1 führt zu verstärkter Spaltung von Caspase-8	56
Abb. 14: Die Expression von DRO1 führt nicht zu einer Steigerung der Apoptoserate bei gleichzeitiger Stimulation des mitochondrialen Apoptoseweges	57
Abb. 15: Bei Expression von DRO1 kommt es nicht zum Anstieg der Apoptoserate bei gleichzeitiger Aktivierung des durch ER-Stress-vermittelten Apoptoseweges. .	59

VII) LITERATURVERZEICHNIS

1. Renz-Polster H., K.S., Braun J., *Basislehrbuch Innere Medizin* 2006: Urban & Fischer.
2. Schalhorn A., K.F., Tymptner C et al., *MANUAL GI Tumoren*. 2006: Tumorzentrum München.
3. Herold G, e.a., *Innere Medizin*. 2010.
4. Schmiegel W, A.R.-S., D. Arnold, U. Graeven, V. Heinemann, R. Porschen, J. Riemann, C. Rçdel, R. Sauer, and W.S. M. Wieser, H.-J. Schmoll, T. Seufferlein, I. Kopp, C. Pox, *S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“*. 2008.
5. Grady, W.M., *Genomic instability and colon cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2004. **23**(1-2): p. 11-27.
6. Ha, N.C., et al., *Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation*. *Mol Cell*, 2004. **15**(4): p. 511-21.
7. Vogelstein, B., et al., *Allelotype of colorectal carcinomas*. *Science*, 1989. **244**(4901): p. 207-11.
8. Hadjihannas, M.V., et al., *Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(28): p. 10747-52.
9. Issa, J.P., *Colon cancer: it's CIN or CIMP*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(19): p. 5939-40.
10. Rassow, *Apoptose und Zellzyklusregultion*. MLP Duale Reihe Biochemie. 2006: Thieme.
11. Bommer, G.T., et al., *DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(9): p. 7962-75.
12. Kolligs, F.T., G. Bommer, and B. Goke, *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis*. *Digestion*, 2002. **66**(3): p. 131-44.
13. Rusan, N.M. and M. Peifer, *Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability*. *J Cell Biol*, 2008. **181**(5): p. 719-26.
14. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. *Science*, 1998. **281**(5382): p. 1509-12.
15. Herbst, A., et al., *ITF-2 is disrupted via allelic loss of chromosome 18q21, and ITF-2B expression is lost at the adenoma-carcinoma transition*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(2): p. 639-48, 648 e1-9.
16. Popat, S. and R.S. Houlston, *A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(14): p. 2060-70.
17. Thiagalingam, S., et al., *Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers*. *Nat Genet*, 1996. **13**(3): p. 343-6.
18. Lynch, H.T. and A. de la Chapelle, *Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer*. *J Med Genet*, 1999. **36**(11): p. 801-18.

19. Niv, Y., *Biologic behavior of microsatellite-unstable colorectal cancer and treatment with 5-fluorouracil*. *Isr Med Assoc J*, 2005. **7**(8): p. 520-4.
20. Boland, C.R. and A. Goel, *The silence of the genes: matching mismatch repair defects with tumors*. *Cancer*, 2003. **98**(10): p. 2091-4.
21. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
22. Jass, J.R., *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. *Histopathology*, 2007. **50**(1): p. 113-30.
23. Curtin, K., et al., *Genetic polymorphisms in one-carbon metabolism: associations with CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon cancer and the modifying effects of diet*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(8): p. 1672-9.
24. Weisenberger, D.J., et al., *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. *Nat Genet*, 2006. **38**(7): p. 787-93.
25. Blagosklonny, M.V., *Molecular theory of cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(6): p. 621-7.
26. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
27. Fynan, T.M. and M. Reiss, *Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis*. *Crit Rev Oncog*, 1993. **4**(5): p. 493-540.
28. Deng, Y. and S. Chang, *Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer*. *Lab Invest*, 2007. **87**(11): p. 1071-6.
29. Compagni, A. and G. Christofori, *Recent advances in research on multistage tumorigenesis*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(1): p. 1-5.
30. Schmidt, U., *Lehrbuch Vorklinik Teil A, "Zellteilung, Zellzykluskontrolle und Apoptose"* 2003: Deutscher Ärzte-Verlag.
31. Alberts B, J.A.e.a., *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 2005: Wiley VCH Verlag GmbH.
32. Karp, G.u.a., *Molekulare Zellbiologie*. 2005: Springer Verlag.
33. Schmitz, S., *Der Experimentator, "Zellkultur"*. 2009: Spektrum Akademischer Verlag.
34. Löffler G, P.P., Heinrich P, *Biochemie und Pathobiochemie*. 2006: Springer-Verlag.
35. Fulda, S., *Inhibitor of apoptosis proteins as targets for anticancer therapy*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007. **7**(9): p. 1255-64.
36. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2861-74.
37. Cho, S.G. and E.J. Choi, *Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases*. *J Biochem Mol Biol*, 2002. **35**(1): p. 24-7.

38. Jin, Z., et al., *Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35829-39.
39. Reed John C. , M., *Caspase Activation Pathways: an Overview*
in *Cancer Medicine* 6. 2003
Holland, Frei.
40. Nakagawa, T., et al., *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 98-103.
41. Hoppe, V. and J. Hoppe, *Mutations dislocate caspase-12 from the endoplasmatic reticulum to the cytosol*. FEBS Lett, 2004. **576**(1-2): p. 277-83.
42. Li, Q., et al., *Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer*. Oncogene, 2001. **20**(30): p. 3929-36.
43. Kuang, E., et al., *ER stress triggers apoptosis induced by Nogo-B/ASY overexpression*. Exp Cell Res, 2006. **312**(11): p. 1983-8.
44. Wei, Y., T. Fan, and M. Yu, *Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(4): p. 278-88.
45. www.sigma-aldrich.com, 2008.
46. Hersey, P. and X.D. Zhang, *Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis*. J Cell Physiol, 2003. **196**(1): p. 9-18.
47. Verhagen, A.M., E.J. Coulson, and D.L. Vaux, *Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs*. Genome Biol, 2001. **2**(7): p. REVIEWS3009.
48. Leaman, D.W., et al., *Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28504-11.
49. Zou, B., et al., *Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1835-43.
50. Varfolomeev, E., et al., *IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis*. Cell, 2007. **131**(4): p. 669-81.
51. Thompson, J.E. and C.B. Thompson, *Putting the rap on Akt*. J Clin Oncol, 2004. **22**(20): p. 4217-26.
52. Zhou, H., et al., *Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level*. J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 483-94.
53. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.

54. Kawasoe, T., et al., *Isolation and characterization of a novel human gene, DRCTNNB1A, the expression of which is down-regulated by beta-catenin*. *Cancer Res*, 2000. **60**(13): p. 3354-8.
55. Fujita, M., et al., *Down-regulation of monocyte chemotactic protein-3 by activated beta-catenin*. *Cancer Res*, 2000. **60**(23): p. 6683-7.
56. Denys, H., et al., *Identification of IGFBP-6 as a significantly downregulated gene by beta-catenin in desmoid tumors*. *Oncogene*, 2004. **23**(3): p. 654-64.
57. *www.ncbi.nlm.nih.gov*. 2008.
58. Meindl, A., et al., *A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa*. *Hum Mol Genet*, 1995. **4**(12): p. 2339-46.
59. Pan, J., et al., *Isolation of a novel gene down-regulated by v-src*. *FEBS Lett*, 1996. **383**(1-2): p. 21-5.
60. Kurosawa, H., et al., *Two candidate downstream target genes for E2A-HLF*. *Blood*, 1999. **93**(1): p. 321-32.
61. Kawai, T., et al., *Isolation of a novel mouse variant of the drs tumor suppressor gene*. *Cancer Lett*, 2002. **183**(1): p. 79-86.
62. Yamashita, A., A. Hakura, and H. Inoue, *Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the drs gene*. *Oncogene*, 1999. **18**(34): p. 4777-87.
63. Ichinose, A., R.E. Bottenus, and E.W. Davie, *Structure of transglutaminases*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(23): p. 13411-4.
64. Tambe, Y., et al., *Tumor prone phenotype of mice deficient in a novel apoptosis-inducing gene, drs*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(4): p. 777-84.
65. Mu, H., et al., *Equarin, a novel soluble molecule expressed with polarity at chick embryonic lens equator, is involved in eye formation*. *Mech Dev*, 2003. **120**(2): p. 143-55.
66. Kumiko Aoki, Y.-J.S., Shunsuke Aoki et al., *Cloning, Expression, and Mapping of a Gene That Is Upregulated in Adipose Tissue of Mice Deficient in Bombesin Receptor Subtype-3*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002. **290**: p. 1282-1288.
67. Tremblay, F., et al., *Bidirectional modulation of adipogenesis by the secreted protein Ccdc80/DRO1/URB*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(12): p. 8136-47.
68. Visconti, R., et al., *Cloning and molecular characterization of a novel gene strongly induced by the adenovirus E1A gene in rat thyroid cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(7): p. 1087-97.
69. Okada, T., et al., *URB is abundantly expressed in adipose tissue and dysregulated in obesity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **367**(2): p. 370-6.
70. Liu, Y., et al., *URB expression in human bone marrow stromal cells and during mouse development*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(2): p. 497-507.

71. Trauth, B.C., et al., *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. Science, 1989. **245**(4915): p. 301-5.
72. Schulze-Osthoff, K., P.H. Krammer, and W. Droge, *Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4587-96.
73. www.axxora.com. 2008.
74. Golstein, P., *Cell death: TRAIL and its receptors*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. R750-3.
75. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
76. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
77. Pan, G., et al., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. Science, 1997. **277**(5327): p. 815-8.
78. Pan, G., et al., *The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. Science, 1997. **276**(5309): p. 111-3.
79. www.R&Dsystems.com. 2008.
80. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 184-95.
81. Thorburn, A., *Death receptor-induced cell killing*. Cell Signal, 2004. **16**(2): p. 139-44.
82. Ying, S. and G. Hacker, *Apoptosis induced by direct triggering of mitochondrial apoptosis proceeds in the near-absence of some apoptotic markers*. Apoptosis, 2007. **12**(11): p. 2003-11.
83. Zheng, J.Y., et al., *The C-terminal transmembrane domain of Bcl-xL mediates changes in mitochondrial morphology*. Biophys J, 2008. **94**(1): p. 286-97.
84. www.proteinkinase.de. 2008.
85. www.applichem.de. 2008.
86. MacKenzie, D.A., et al., *UPR-independent dithiothreitol stress-induced genes in Aspergillus niger*. Mol Genet Genomics, 2005. **274**(4): p. 410-8.
87. Zhang, Q.X., et al., *Role of stress-activated MAP kinase P38 in cisplatin- and DTT-induced apoptosis of the esophageal carcinoma cell line Eca109*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(29): p. 4451-6.
88. Bornkamm, G.W., et al., *Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(16): p. e137.
89. Allen, S., et al., *Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(2): p. 460-4.

90. Rehm, H., *Der Experimentator/PROTEINCHEMIE/PROTEOMICS*: ELSEVIER, Spektrum Verlag.
91. Eckert Werner A., K.J., *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion*. 1997: Springer.
92. Hancock, K. and V.C. Tsang, *India ink staining of proteins on nitrocellulose paper*. Anal Biochem, 1983. **133**(1): p. 157-62.
93. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. Cell, 1991. **66**(3): p. 589-600.
94. Kinzler, K.W., et al., *Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers*. Science, 1991. **251**(4999): p. 1366-70.
95. Nishisho, I., et al., *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients*. Science, 1991. **253**(5020): p. 665-9.
96. Li, Q.X., et al., *Selective anticancer strategies via intervention of the death pathways relevant to cell transformation*. Cell Death Differ, 2008. **15**(8): p. 1197-210.
97. Tambe, Y., et al., *A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene*. Oncogene, 2004. **23**(17): p. 2977-87.
98. Kim, C.J., et al., *Down-regulation of drs mRNA in human prostate carcinomas*. Hum Pathol, 2003. **34**(7): p. 654-7.
99. Mukaisho, K., et al., *Down-regulation of drs mRNA in colorectal neoplasms*. Jpn J Cancer Res, 2002. **93**(8): p. 888-93.
100. Shimakage, M., et al., *Downregulation of drs mRNA expression is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma*. Int J Oncol, 2007. **30**(6): p. 1343-8.
101. Shimakage, M., et al., *Down-regulation of drs mRNA in human colon adenocarcinomas*. Int J Cancer, 2000. **87**(1): p. 5-11.
102. Shimakage, M., et al., *Downregulation of drs tumor suppressor gene in highly malignant human pulmonary neuroendocrine tumors*. Oncol Rep, 2009. **21**(6): p. 1367-72.
103. Evan, G. and T. Littlewood, *A matter of life and cell death*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1317-22.
104. www.cellsignaling.com

VIII) DANKSAGUNG

Am Schluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben:

Vielen Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Frank Kolligs für die Vergabe des interessanten Themas, für die gute Betreuung beim Erstellen dieser Arbeit und für die schnellen Antworten bei Fragen oder Schwierigkeiten.

Mein Dank geht auch an das ganze Team der Arbeitsgruppe Kolligs, insbesondere an meinen Betreuer Dr. Andreas Herbst für die geduldige Einarbeitung in das Thema und die einzelnen Methoden, die gute Betreuung während der ganzen Zeit und die schnelle Hilfe bei Fragen und Problemen und die Geduld! Vielen, vielen Dank!

Auch möchte ich mich an dieser Stelle bei Andrea Ofner und Isabella Wolf ganz herzlich für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche, die fachliche Unterstützung, die aufmunternden Worte und die schöne Zeit im Labor bedanken! Ich danke auch meiner Mitdoktorandin und Freundin Constanze Bayer für die gute Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner lieben Familie, die mir mein Studium und das Erstellen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat, von ganzem Herzen für die Unterstützung, das Verständnis, die Geduld, die aufmunternden Worte und dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, bedanken.

