

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

Direktor Prof. Dr. B. Göke

**Charakterisierung des Tumorsuppressorgenkandidaten DRO1 und seiner
Rolle in der Rezeptor-vermittelten Apoptose**

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

vorgelegt von

Constanze Bayer
geb. Frank

aus

Erlangen

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Kolligs

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Carole Bourquin
Priv. Doz. Dr. Markus Guba

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. A. Herbst

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2011

Meiner Familie

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1 Kolorektales Karzinom	7
1.2 Apoptose.....	9
1.2.1 Caspasen.....	10
1.2.2 Extrinsischer Apoptosesignalweg	12
1.2.3 Intrinsischer Apoptosesignalweg	13
1.2.4 Apoptosemoleküle.....	16
1.2.4.1 Caspase-8	16
1.2.4.2 FADD	17
1.2.4.3 Phosphoryliertes FADD	20
1.2.4.4 FLIP.....	21
1.3 Tumorgenese	23
1.3.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	24
1.3.2 Zellphysiologische Eigenschaften von Karzinomzellen	24
1.3.3 Therapieansätze	25
1.3.4 Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms	26
1.4 Tumorsuppressorgenkandidat DRO1	27
1.5 Fragestellung	31
2. Material und Methoden	33
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.1.1 PCR	33
2.1.2 Auftrennung von DNA-Molekülen im Agarosegel.....	34
2.1.3 Gelextraktion.....	35
2.1.4 Ethanolpräzipitation von DNA-Molekülen.....	35
2.1.5 Anhängen von Adenosin an PCR-Produkte.....	35
2.1.6 TOPO-TA-Cloning®	36
2.1.6.1 Ligation	36
2.1.6.2 Transformation	36
2.1.6.3 S.O.C. Medium.....	37
2.1.6.4 Agarplatten	37
2.1.7 Screening der Bakterienklone	37
2.1.8 Amplifikation und Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	38
2.1.8.1 LB-Medium	39
2.1.8.2 Glycerolstocks	39
2.1.8.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA	39
2.1.8.4 Bestimmen der DNA-Konzentration.....	39

2.1.9 Sequenzierung	39
2.1.10 Restriktionsverdau.....	40
2.1.11 Ligation und Transformation	41
2.2 Zellkultur	42
2.2.1 Grundlagen	42
2.2.1.1 Zelllinien	42
2.2.1.2 Auftauen der Zellen.....	42
2.2.1.3 Splitten der Zellen	42
2.2.2 Apoptoseassay	43
2.2.3 Transfektion von Zellen	44
2.2.4 Colony Forming Assay.....	44
2.3 Proteinbiochemische Methoden	46
2.3.1 Zellernte und Lyse.....	46
2.3.2 Bestimmen der Proteinkonzentration	46
2.3.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese	47
2.3.3.1 Vorbereiten der Proben	47
2.3.3.2 Acrylamid-Gele	47
2.3.3.3 Laufpuffer.....	48
2.3.3.4 Gelelektrophorese.....	48
2.3.4 Western Blot.....	48
2.3.5 Immundetektion	49
3. Ergebnisse	51
3.1 Generieren von DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1- Zellen.....	51
3.2 Expression von DRO1 sensitiviert Zellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose.....	51
3.3 DRO1 verändert die Expressionsmenge einiger Apoptosemoleküle	53
3.3.1 Expression von DRO1 verstärkt die Umwandlung von Caspase 8 in seine aktive Form	53
3.3.2 Expression von DRO1 verstärkt die Bildung der aktiven Form von FADD	55
3.3.3 Expression von DRO1 bewirkt keine Zunahme der Menge an phosphoryliertem FADD	57
3.3.4 Expression von DRO1 hat einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von FLIP58	
3.4 DRO1-Konstrukte mit zwei <i>Internal Repeats</i> können ebenso wie DRO1-Wildtyp Koloniewachstum hemmen	60
3.4.1 Erstellen der DRO1-Konstrukte	60
3.4.2 <i>Colony Forming Assays</i>	63
4. Diskussion	70
4.1 Einfluss von DRO1 auf Moleküle des Apoptosesignalweges.....	71
4.1.1 Expression von DRO1 verstärkt die Umwandlung von Caspase-8 in seine aktive Form	71

4.1.2 Expression von DRO1 verstärkt die Bildung der aktiven Form von FADD	72
4.1.3 Expression von DRO1 bewirkt keine Zunahme der Menge an phosphoryliertem FADD	73
4.1.4 Expression von DRO1 hat einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von FLIP74	
4.2 Bedeutung der DRO1-Struktur für die Tumorsuppression	75
4.2.1 Deletionskonstrukte des Tumorsuppressorgenkandidaten DRO1.....	75
4.2.2 Deletionskonstrukte des Tumorsuppressorgens DRS	76
4.2.4 Ausblick	77
5. Zusammenfassung.....	79
6. Danksagung.....	81
7. Literaturverzeichnis.....	82

1. Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist mit jährlich ca. 70.000 Neuerkrankungen in Deutschland sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung nach dem Bronchial- bzw. dem Mamma- Karzinom (1). Das Lebenszeitrisko in der Normalbevölkerung jenseits des 40. Lebensjahres, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt 6%; die Erkrankung tritt bevorzugt nach dem 50. Lebensjahr auf (2).

Zu den Risikofaktoren bei der Entstehung dieser Tumoren zählen unter anderem Ernährungsfaktoren wie z.B. ballaststoffarme Ernährung, verstärkter Fleisch- und Fettkonsum und Übergewicht (2). Dabei wird vermutet, dass durch bakterielle Gärungs- und Fermentierungsprozesse im Kolon und Rektum aus Proteinen, Gallensäuren und Cholesterin kanzerogene und kokanzerogene Stoffe entstehen. Bei ballaststoffarmer Ernährung verweilen die Speisereste länger im Darm und somit können höhere Konzentrationen dieser Stoffe anfallen. Diese These könnte zumindest als Teilursache für die Karzinomentstehung in Betracht gezogen werden (3). Protektiv scheinen eine Ballaststoff- und kalziumreiche, fett- und fleischarme Ernährung zu sein, ebenso wie eine schnelle Stuhlpassage und Einnahme von Vitamin C, Folsäure, ASS und NSAR (2).

Als weitere Risikofaktoren können zudem vorangegangene kolorektale Adenome oder Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Mamma- und Ovarial- Karzinom und starker Alkohol- und Nikotinkonsum die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms begünstigen (4).

Bei bestimmten genetischen Erkrankungen ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieses Tumors allerdings am höchsten. Zu diesen Präkanzerosen gehören die autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) mit einem Erkrankungsrisiko von bis zu 100% und das Lynch-Syndrom (= hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinomsyndrom, HNPCC) mit einem Risiko von ca. 80% (5).

Die Symptome für ein kolorektales Karzinom sind leider meist uncharakteristisch, Warnhinweise sind dabei vor allem Blutbeimischung im Stuhl, Änderung der Stuhlgewohnheiten und Leistungsminderung. Ileus, Blutungsanämie, Schmerzen und eventuell ein von außen tastbarer Tumor treten erst sehr spät auf (2).

Zu den aktuellen Vorsorgeuntersuchungen zählen der FOBT (fäkaler Okkultblut-Test), der bei Nicht-Risiko-Patienten ab dem 50. Lebensjahr einmal jährlich erfolgen sollte und die digital-rektale Untersuchung – ebenso einmal jährlich ab dem 45. Lebensjahr (1), da 10% der

Tumoren tastbar sind (2). Wichtig ist, schon bei einmalig positivem FOBT eine Koloskopie durchführen zu lassen. Die Koloskopie stellt die zuverlässigste Screeninguntersuchung dar; der Vorteil ist zudem, dass in der selben Sitzung adenomatöse Polypen – die als Früh- oder Vorstadium des Tumors gelten – relativ komplikationsarm abgetragen werden können und somit zugleich therapeutisch vorgegangen werden kann. Zusätzlich kann Gewebe für Biopsien entnommen werden. Die Endoskopie sollte im 50. Lebensjahr zum Ersten Mal durchgeführt werden, bei unauffälligem Befund erneut nach 10 Jahren (6), bei Risikopersonen erfolgt die Erstuntersuchung eventuell schon in der Jugend und in kürzeren Kontrollabständen.

Ist die Diagnose bereits gesichert, sollten zum Staging eine Abdomen-Sonographie zur Suche nach Lebermetastasen, ein Röntgenbild des Thorax in zwei Ebenen und bei Rektumkarzinomen noch eine Endo-Sonographie zur genauen Bestimmung von Tumorgröße und Infiltrationstiefe durchgeführt werden (6). Zusätzlich werden Tumormarker (CEA, CA 19-9) bestimmt, auch ein Spiral-CT oder PET kann erwogen werden (2).

Etwa 50% aller kolorektalen Karzinome finden sich im Rektum, ca. 30% im Kolon sigmoideum, ca. 10% im Caecum bzw. im Kolon ascendens und weitere 10% im übrigen Kolon (2); bei 2-3% der Patienten treten Mehrfachkarzinome auf.

Die typischen Metastasierungswege führen in Leber und Lunge, sowie zu paraaortalen, inguinalen und Beckenwand-Lymphknoten (2). Bei Tumoren, die bis ins untere Drittel des Rektums reichen, finden sich häufig primär Lungenmetastasen (5).

Das kolorektale Karzinom wird in TNM-Stadien eingeteilt, danach richten sich die Therapieoptionen. Die früher übliche Dukes-Klassifikation ist heute nur noch selten gebräuchlich (5).

Die Therapiestrategie richtet sich nach Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors sowie nach eventuell vorhandenen Metastasen (6). Dabei stehen die neoadjuvante Radio-Chemotherapie, adjuvante Therapieformen nach chirurgischer Exstirpation oder palliative Therapien zur Verfügung. Entscheidend für eine kurative Operation ist die systematische En-Bloc-Resektion des Primärtumors mit Entfernung des gesamten Lymphabflussgebietes (4).

Rezidive treten zu 10-30% bevorzugt in den ersten beiden postoperativen Jahren auf. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt abhängig vom Tumorstadium zwischen 5 und 95% (2), daher sind eine frühzeitige Entdeckung der Krankheit und damit die Inanspruchnahme von Vorsorgeuntersuchungen von extremer Bedeutung.

Kolorektale Tumoren entstehen meist aus intraepithelialen Neoplasien (IEN), die zu 90% Adenome sind (2). Adenome sind somit als präkanzeröse Läsion anzusehen, das Entartungsrisiko ist abhängig von der Adenomgröße, der histologischen Differenzierung und

der Wuchsform (3). Sie breiten sich bevorzugt quer zur Darmachse aus und tendieren zu zirkulärem Wachstum (3). Aus den Adenomen kann sich in einem mehrstufigen Prozess, der sogenannten „Adenom-Karzinom-Sequenz“, das kolorektale Karzinom bilden (3):

Dazu wird in der ersten Phase der Neoplasie-Entstehung im Kolon das APC-Gen (*Adenomatous Polyposis Coli*), das normalerweise als Tumorsuppressor agiert, inaktiviert. Gehen beide Allele des APC-Gens verloren, führt dies auch zu einem veränderten Expressionsprofil anderer Gene oder Proteine z.B. des Cadherin-Catenin-Komplexes. Neben dem Normalepithel werden aberante und dysplastische Krypten sichtbar (5), die Adenome sind noch kleiner als 1 cm und tubulär (2).

Die zweite Phase ist das intermediäre Stadium. Es kommt zu aktivierenden Mutationen von K-ras – einem Onkogen (7) – und Veränderungen auf Chromosom 18q, dabei sind v.a. die Gene SMADH, SMAD2 und DCC betroffen. Es bilden sich Adenome mit niedrig- und mittelgradigen Dysplasien (5), sie sind ca. 2 cm groß und tubulovillös (2).

Den Übergang zu hochgradig dysplastischen Adenomen und Karzinomen bildet die dritte Phase durch Mutation des Tumorsuppressorgens p53, das auf dem Chromosom 17p lokalisiert ist (5).

Bei der FAP ist der gesamte Vorgang beschleunigt, da durch Keimbahnmutationen bereits ein APC-Allel mutiert ist und es dadurch zu einer veränderten Signalvermittlung kommt, bei HNPCC liegt ein Defekt in den Reperaturgenen vor (5).

Nach dem Tumorprogressionsmodell nach Vogelstein und Fearon dauert der Übergang von Normalgewebe über das Adenom bis hin zum Karzinom durch verschiedene genetische Veränderungen ca. zehn Jahre (2). Es kommt dabei zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen. Zunächst kann noch kontrolliertes Wachstum vorliegen, wird allerdings eine kritische Gesamtzahl an genetischen Veränderungen überschritten, resultiert ein unkontrolliertes malignes Wachstum (2).

1.2 Apoptose

Eine weitere wichtige Rolle bei der Entwicklung von Tumoren spielt der Apoptoseprozess:

Die Apoptose – oder auch „programmierter Zelltod“ genannt – ist ein normales zelluläres Geschehen, bei dem ein hochkomplexer Prozess bis zum Tod der Zelle führt (8). Der Ablauf erfolgt streng geordnet und immer nach dem gleichen Prinzip (8). Es gilt die „Alles-oder-Nichts-Regel“, das heißt, hat die Apoptose einmal begonnen, kann der Vorgang nicht mehr gestoppt werden und ist auch nicht umkehrbar (9). Es können dabei auch einzelne Zellen

eines ansonsten gesunden Organes zu Grunde gehen (10), also werden nicht nur Zellen apoptotisch, die genetisch irreparabel fehlerhaft sind und somit eine Gefahr für die Entwicklung eines Tumors bilden könnten, sondern auch Zellen, die der Organismus nicht mehr benötigt, z.B. während der Embryonalzeit (9). Außerdem soll durch die Apoptose die Zahl der Zellteilungen ausgeglichen werden, damit Gewebe weder zu sehr wachsen noch schrumpfen (10). Die Apoptose ist zudem der effektivste Mechanismus, um viral infizierte Zellen zu eliminieren (11). Empfängt eine Zelle an den Rezeptoren der Zelloberfläche keine Wachstumsfaktor- oder Überlebenssignale mehr, z.B. PDGF, NGF, kann sie selbstständig ihr Selbstmordprogramm beginnen (12). Auch für die Entwicklung des Immunsystems, des Nervensystems und bei der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten sowie Alzheimer und Parkinson, aber auch bei Ischämien, AIDS und vielem mehr spielt die Apoptose eine wichtige Rolle (13).

Am Ablauf sind zahlreiche zelluläre Faktoren beteiligt: Zelloberflächenrezeptoren, wie der TNF-Rezeptor, Zellzyklusregulatoren, z.B. pRb und Cdk-Inhibitoren, proteolytische Enzyme – vor allem Caspasen –, die Bcl-2-Familie, IAP's (*Inhibitor of Apoptosis Protein*), Stress-Antwort-Proteine, z.B. Hitzeschock-Proteine und Zelladhäsionsproteine (13).

Der programmierte Zelltod ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle und der Zellkern zunächst durch Kondensation des Chromatins an Volumen verlieren und Kontakte zu Nachbarzellen aufgeben (10). Der Zellkern wird fragmentiert, die Zelle zerfällt, verpackt sich in kleine Bläschen und wird schließlich von Makrophagen phagozytiert, ohne dass Zellbestandteile in die extrazelluläre Umgebung gelangen können und somit eine Entzündung ausgelöst werden könnte (8) (14). Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zur Nekrose dar, bei der durch Zellschwellung und Freisetzung des intrazellulären Inhalts immunologische und entzündliche Prozesse ausgelöst werden (12).

1.2.1 Caspasen

Eine entscheidende Rolle während des Ablaufs der Apoptose spielen Caspasen (*Cysteine-dependent aspartic specific protease*) (10) (15). Caspasen sind Cysteinproteasen – also proteolytische Enzyme –, die schon sehr früh im Apoptosesignalweg aktiviert werden und besonders wichtig für die Aktivierung oder auch Inaktivierung anderer Proteine sind, indem sie diese hinter Aspartyl-Resten spalten (8) (16). Die proteolytische Spaltung der Proteine kann somit entweder zu einem Funktionsgewinn oder zur Zerstörung und damit zum Funktionsverlust des Moleküls führen (17). Caspase-Substrate sind unter anderem einige Proteinkinasen, z.B. die Fokale Adhäsionskinase FAK, die vermutlich für die Aufhebung der

Zelladhäsion verantwortlich ist, zusätzlich PBK, PKC und Raf1 (11). Außerdem werden Lamine durch Caspasen beeinflusst; diese führen zum Zerfall der Kernmatrix und zum Schrumpfen des Zellkerns. Des Weiteren können Proteine des Cytoskeletts gespalten werden, was eine Veränderung der Zellform zur Folge hat. Weitere Substrate sind Zellzyklus-Regulatoren, Reparaturproteine und schließlich die Endonuklease CAD (Caspase-aktivierte DNase), die die DNA im Zellkern zerlegt (8) (11).

Intrazellulär liegen Caspasen als enzymatisch inaktive Procaspasen vor (10). Durch limitierte Proteolyse werden sie gegenseitig kaskadenartig von bereits gespaltenen Caspasen aktiviert (9); das Signal wird dadurch vervielfacht (17). Caspasen besitzen eine katalytische Domäne (18); die aktive Caspase ist ein Homodimer, bei der jedes Monomer aus einer großen und einer kleinen Untereinheit besteht (11). Es ist allerdings möglich, dass Caspasen zur Kontrolle ihrer Katalyse-Effizienz und Substratspezifität Koenzyme benötigen (11). Zudem gibt es Hinweise, dass Caspasen in weit mehr Prozesse integriert sind, als nur bei der Apoptose, z.B. bei inflammatorischen Vorgängen oder der Zelldifferenzierung (11).

Man unterteilt Caspasen in Effektor- und Initiatorcaspasen (10). Effektorcaspasen (z.B. Caspase 3, 6, 7) spalten und inaktivieren wichtige zelluläre Proteine, z.B. Reperaturenzyme, Lamine oder die Proteinkinase C. Zusätzlich können sie die oben genannte Endonuklease CAD aktivieren. Sie sind verantwortlich für die geordnete Zerstörung der Zelle. Effektorcaspasen werden hauptsächlich durch limitierte Proteolyse über Initiatorcaspasen aktiviert (15). Initiatorcaspasen – auch Adaptercaspasen genannt, z.B. Caspase 2, 8, 9, 10, 11 und 12 – sind entscheidend für die Aktivierung des Apoptoseweges (14). Dabei stellen sie das Bindeglied zwischen Apoptosesignal und Effektorcaspasen dar (10). Initiatorcaspasen sind substratspezifisch (15). Sie besitzen am N-terminalen Ende eine DED (*death effector domain*) oder homotype CARD (*caspase-recruitment domain*); diese Domänen lenken die monomeren Procaspasen zur Oligomerisierung bzw. Dimerisierung und die Caspasen werden dadurch aktiviert (15) (13) (19). Dieser Vorgang ist entscheidend für Initiatorcaspasen, da zu Beginn des Apoptosevorgangs noch keine proteolytisch aktiven Enzyme vorhanden sind. Sie können auch schneller in die aktive Form übergehen als Effektorcaspasen (15). Bei Effektorcaspasen konnten bisher keine derartigen Domänen nachgewiesen werden (15). Initiatorcaspasen können zum Einen durch extrazelluläre Faktoren über den TNF α -Rezeptorweg oder durch intrazelluläre Mechanismen auf dem mitochondrialen Weg stimuliert werden (10). Beim Ablauf der Apoptose kann man zwischen diesen beiden Apoptosesignalwegen – dem extrinsischen und dem intrinsischen Apoptosesignalweg – unterscheiden. Beide münden in einer gemeinsamen Endstrecke, werden aber unterschiedlich aktiviert (8).

1.2.2 Extrinsischer Apoptoseweg

Der extrinsische Weg wird auch todesrezeptorvermittelter Signalweg genannt, da sich ein extrazelluläres Protein – der Tumornekrosefaktor (TNF) – an den TNF-Rezeptor (TNFR1) einer Zelle bindet. TNF wird z.B. nach Virusinfektionen, Einwirkung von ionisierender Strahlung oder toxischen Chemikalien von Immunzellen gebildet (8). Die Todesrezeptoren sind auf der Zelloberfläche gelegen und enthalten Cystein-reiche Domänen (CRDs) (19). Jeder Rezeptor besitzt intrazellulär eine einzelne Todesdomäne (DD), die verantwortlich für die Rekrutierung verschiedener Adapterproteine ist (19). Neben dem eigentlichen TNF α -Rezeptor gehört unter anderem auch der Fas- oder CD95-Rezeptor zur TNF-Rezeptor-Superfamilie (10).

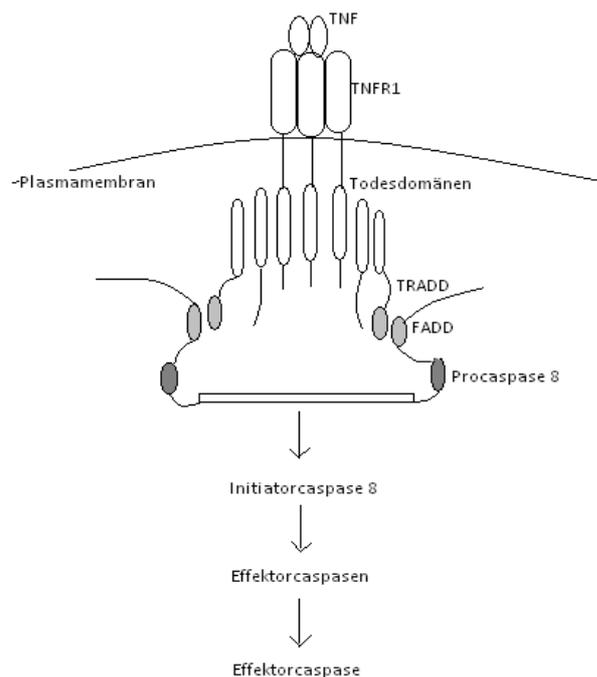


Abb. 1 Extrinsischer Apoptoseweg (8)

Sobald TNF an einen TNF-Rezeptor bindet, werden die Adapterproteine FADD und TRADD zusammen mit Procaspase-8 zu einem Multiproteinkomplex verbunden. Procaspase-8 und FADD interagieren über Apoptose-Effektor-Domänen. Sind drei Procaspase-8-Moleküle vereint, wird Caspase-8 durch Spaltung aktiviert und kann nun weitere Effektorcaspasen aktivieren.

An den Fas-Rezeptor bindet vor allem der FasL, der Fas-Ligand (14), es können aber – abhängig vom Zelltyp – auch andere Moleküle binden, z.B. GCDC (*glycine conjugate of*

chenodeoxycholate) (20). Wird der CD95(APO1/Fas)-Rezeptor durch einen Liganden stimuliert, kommt es innerhalb weniger Minuten zur Cluster-Bildung der CD95-Rezeptoren; das bedeutet, die Rezeptoren kommen plötzlich gehäuft an der Zelloberfläche vor, um intrazellulär das Signal zu verstärken (21). Durch Andocken von TNF an den Rezeptor verbindet der aktivierte Rezeptor die zytoplasmatischen Adapterproteine TRADD und FADD, sowie die Procaspase 8 zu einem Multiproteinkomplex an der inneren Plasmamembran (8). Dieser wird auch als DISC bezeichnet und im Weiteren noch genauer besprochen.

FADD (*Fas-associated death domain*) und TRADD (*TNFR-associated death domain protein*) sind die zytoplasmatischen Domänen des TNF-Rezeptors; sie agieren über homologe Regionen miteinander, die Todesdomänen genannt werden. Diese Todesdomänen – dazu gehören DD, DED und CARD – kommen in vielen Proteinen vor und vermitteln Protein-Protein-Wechselwirkungen, sind aber nicht enzymatisch aktiv (8) (22). Procaspase 8 und FADD interagieren ebenso über homologe Regionen – die Apoptose-Effektor-Domänen. Sobald die Procaspasenmoleküle in einem Komplex vereint sind, spalten sie sich gegenseitig und bilden ein aktives Caspase-8-Molekül. Caspase-8 ist eine Initiatorcaspase (8); sie initiiert die Apoptose durch Spaltung und Aktivierung nachgeschalteter Effektorcaspasen, z.B. Caspase 3, die dann die kontrollierte Selbstzerstörung der Zelle bewerkstelligen (8). Letztendlich bewirkt beim extrinsischen Apoptosesignalweg die Bindung eines extrazellulären Liganden eine Konformationsänderung des Rezeptors, aus der die Bindung und Aktivierung nachgeschalteter Proteine im Signalweg resultiert (8).

1.2.3 Intrinsischer Apoptosesignalweg

Der intrinsische Apoptosesignalweg ist ein mitochondrienvermittelter Signalweg (8). Er wird durch interne Stimuli ausgelöst, z.B. bei irreparablen genetischen Schäden, hohen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen, oxidativem Stress mit großen Mengen an freien Radikalen und fehlenden Wachstumsfaktoren (8) (23). Aktiviert wird dieser Prozess durch Proteine der Bcl-2-Familie. In dieser gibt es proapoptische Proteine, z.B. Bad, Bid, Bim und Bax, die den Zelltod fördern, indem sie z.B. bestimmte Proteine binden (9). Sie befinden sich im Zytosol (24). Es gibt aber auch antiapoptische Vertreter, z.B. Bcl-x_L, Bcl-w und Bcl-2, die apoptotische Prozesse in Zellen verhindern und in der äußeren Mitochondrienmembran sitzen (24). Das Vorhandensein sowohl der pro- als auch der antiapoptischen Proteine ist für den Organismus von enormer Bedeutung. So zeigten Mäuse bei Fehlen der einen oder anderen Proteine schwere Defekte in der Entwicklung des Nervensystems (12). Veranlassen interne Stimuli, dass eine Zelle apoptotisch wird, wandern proapoptische Bcl-2-Proteine wie

z.B. Bax aus dem Zytosol zur Mitochondrienmembran und inserieren an dieser (8). Dadurch erhöht sich die Permeabilität der Membran und das Mitochondrium setzt Cytochrom-c-Moleküle aus dem Membranzwischenraum frei (8). Spätestens ab diesem Zeitpunkt, kann der Apoptosevorgang nicht mehr gestoppt werden (11) (20). Es wird vermutet, dass antiapoptotische Moleküle diese Freisetzung verhindern können (8). Neben Cytochrom c werden noch weitere proapoptotische mitochondriale Protein freigesetzt, nämlich AIF (*apoptosis-inducing factor*) und Omi/HtrA2 (13) (25). AIF kann sowohl ins Zytosol, als auch in den Zellkern wandern und soll dort die Chromatin-Kondensation fördern (13). Außerdem kann es die Cytochrom-c-Freisetzung steigern und induziert so vermutlich auch Caspase-unabhängig die Apoptose (13).

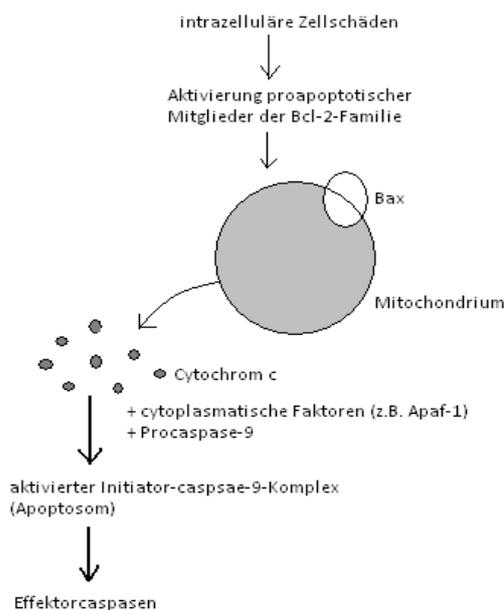


Abb. 2 Intrinsischer Apoptosesignalweg (8)

Verschiedene Arten von Zellstress veranlassen apoptotische Vertreter der Bcl-2-Familie zur Insertion an die äußere Mitochondrienmembran. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Cytochrom-c-Molekülen. Cytochrom c bildet mit Apaf-1 und Procaspase-9 das Apoptosom und die aktivierte Caspase-9 kann nun Effektorcaspasen aktivieren und die Apoptose voran treiben.

Die Cytochrom-c-Moleküle bilden zusammen mit dem zytosolischen Protein Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) und Procaspase-9-Molekülen einen Multiprotein-

komplex, der als Apoptosom (Apoptosekörperchen) bezeichnet wird (8). Dieses wird anschließend ATP-abhängig oligomerisiert und aktiviert dadurch die Procaspase-9 (10). Die Initiatorcaspase-9 spaltet und aktiviert wiederum Effektorcaspasen, die weitere Vorgänge im Apoptosesignalweg antreiben (8).

Neben den antiapoptotischen Proteinen in der Bcl-2-Familie gibt es als intrazelluläre Apoptose-Kontrollproteine auch die IAP-Familie (*inhibitor of apoptosis*) (9). Sie können den Zelltod unterdrücken, indem sie an Procaspasen und Caspasen binden und ihre Aktivierung verhindern (9). Setzen die Mitochondrien ihr Cytochrom-c frei, um Apaf-1 zu aktivieren, setzen sie gleichzeitig Proteine frei, die die IAPs blockieren (9). Dabei handelt es sich um Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*) und DIABLO (*direct IAP-binding protein with low pI*) (13); die Apoptose wird somit beschleunigt. Neben IAP gibt es noch weitere Caspase-Inhibitoren, z.B. p35 und CrmA (11) (26).

Extrinsischer und intrinsischer Signalweg aktivieren letztendlich die gleichen Effektorcaspasen und haben somit dieselben zellulären Zielmoleküle (8). Dennoch laufen beide Wege unabhängig voneinander ab (23). Eine Verbindung zwischen ihnen stellt das Bcl-2-Protein Bid dar (10). Es wird durch Caspase 8 proteolytisch gespalten; das entstandene Bruchstück tBid (*truncated bid*) kann die Freisetzung von Cytochrom-c und weiteren proapoptotischen Faktoren bewirken (10). Eine weitere Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg ist Caspase-6, die z.B. von Caspase-3 nach der Mitochondrien-Aktivierung gespalten wird und dann – Todesrezeptor-unabhängig – Caspase-8 aktivieren kann (27) (28).

Der programmierte Zelltod kann aber auch über die dauerhafte Stimulation von stressaktivierten Proteinkinasen ausgelöst werden (13). Über diese MAPK- (*Mitogen-activated protein kinase*)-Signalwege werden intrazellulär Signale vermittelt, die durch verschiedene extrazelluläre Stimuli ausgelöst werden (13). Dazu zählen Hitzeschock, osmotische Veränderungen, metabolischer Stress und proinflammatorische Zytokine (13). Dies führt zu verschiedenen zellulären Vorgängen wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (13).

Der Apoptosemechanismus ist mit dem Zellzyklus über den Tumorsuppressor p53 verknüpft (10). Bei DNA-Schädigung schickt p53 die Zelle in der G1-Phase in Arrest, um den Fehler zu beheben. Kann der Defekt nicht behoben werden, oder ist dieser schon zu umfangreich, induziert p53 die Expression des bax-Gens; die Apoptose wird eingeleitet (10). Dazu wird

zunächst die Expression von PIDD gefördert; dieses bindet wiederum an RAIDD und Caspase-2 (14).

Fehler beim programmierten Zelltod können sowohl zum Auftreten von Tumoren, aber auch zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten und neurodegenerativen Erkrankungen beitragen (10).

1.2.4 Apoptosemoleküle

In dieser Dissertation wurden vor allem die *Death-Effector-Domain*-Proteine Caspase-8, FADD, phospho-FADD und FLIP genauer untersucht und beschrieben.

1.2.4.1 Caspase-8

Caspase-8 ist die Schlüssel-Initiatorcaspase; sie startet den Apoptosesignalweg direkt nach Stimulation eines TNF-Rezeptors durch Spaltung und Aktivierung nachgeschalteter Effektorcaspasen, die dann die kontrollierte Selbstzerstörung der Zelle bewerkstelligen (8). Auf die Aktivierung im Rahmen der Bildung des DISC wird im Folgenden noch genauer eingegangen.

Das inaktive Procaspase-8-Molekül ist 55 kDa groß, 480 Aminosäuren lang und wird nach Aktivierung im DISC in kleinere Einheiten von 12 und 20 kDa gespalten (29) (30) (31). Caspase-8 besitzt – wie die meisten Initiatorcaspasen – eine lange N-terminale Prodomäne mit über 90 Aminosäuren, die wichtig für die Ausübung ihrer Funktion ist (19). Die Prodomäne der Effektorcaspasen hingegen besteht nur aus ca. 20-30 Aminosäuren (19). Wird die Procaspase gespalten, wird dabei das N-terminale Ende abgeschnitten und die aktive Caspase-8 kann von der Zellmembran, über die sie mit dem Todesrezeptor verbunden ist, in das Zytosol wandern (32). Das aktive Molekül liegt als Heterotetramer vor und besteht aus zwei langen und zwei kurzen Untereinheiten (30). Außerdem besitzt Caspase-8 zwei DEDs; über dieses „Todesadapter-Modul“ kann sie an verschiedene Proteine binden, so z.B. mit FADD interagieren und es als Integrations-Plattform für andere Proteine nutzen (17). Wichtige Substrate, die durch Caspase-8 gespalten werden sind Bid – als Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg – und die Caspasen 3, 6 und 7 (14). Die Caspase-8-Funktion kann durch c-FLIP gehemmt werden (16). Ihre Aktivierung kann z.B. durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase blockiert werden (20), durch das Pockenvirus CrmA (26), das Baculovirus p35 oder durch die IAPs (31).

Das Caspase-8-Molekül tritt in hohen Konzentrationen vor allem in Muskelgewebe, Gehirn und Leukozyten auf (31). Es besitzt eine hohe Ähnlichkeit zur Caspase-10, die nur bei

Menschen vorhanden ist, allerdings haben beide Caspasen verschiedene Funktionen bei der T-Zell-Differenzierung (15). Es wird vermutet, dass Caspase-10 ein Tumorsuppressor sein könnte, da in verschiedenen Tumoren Mutationen dieser Caspase festgestellt wurden (11). Dieses Phänomen wird nun aber – neben weiteren Caspasen – auch für Caspase-8 beschrieben (15) (11) (22). So konnte nachgewiesen werden, dass in verschiedenen menschlichen Krebszellen Caspase-8 inaktiv vorliegt; dies könnte ein vielversprechender Ansatz für die Erforschung von Resistenzmechanismen und der Entwicklung neuer Therapien sein (30).

Neue Erkenntnisse zeigen aber, dass Caspase-8 neben der Apoptose noch an weiteren wichtigen Vorgängen in der Zelle beteiligt ist (32). Zu diesen Aufgaben zählen die Vermittlung von Zellbewegungen und Adhäsion der Zellmatrix (22) (29), Mitwirkung bei der Proliferation von B- und T-Zellen (29) (16), Aufrechterhaltung der Lymphozytenmenge (33) und die Aktivierung von NF- κ B (32). Außerdem spielt Caspase-8 eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung (32). Im Tierexperiment wurde anhand von Knock-Out-Mäusen untersucht, welche Konsequenzen das Fehlen von Caspase-8 nach sich ziehen würde: Die Mäuse-Embryonen verstarben bereits am 11.Tag; es zeigten sich erhebliche Beeinträchtigungen bei der Entwicklung des Herzmuskels und abdominelle Blutungen aufgrund von Hyperämie (11). Die Ausbildung des Gefäßsystems im Dottersack war abnorm verändert (34). Außerdem war eine stark erhöhte Anzahl an myeloischen Vorläuferzellen zu verzeichnen und die Leber zeigte eine vermehrte Erythrozytenanreicherung (11) (34). Der Rezeptor-induzierte Apoptose-Signalweg konnte nicht mehr aktiviert werden, allerdings konnte über andere Signalwege der Zelltod noch eingeleitet werden, wie z.B. durch UV-Bestrahlung (11). Mutationen im Caspase-8-Gen können zu einer erschwerten Bildung von Lymphozyten und multiplen Defekten der B-, T- und NK-Zellen führen und die Betroffenen leiden somit häufig an Immundefekten (15) (33). Caspase-8 kann die Stammzellproliferation fördern, aber zugleich vor maligner Transformation schützen (35).

Es gibt Hinweise, dass die ungeschnittene Procaspase-8 oder auch die phosphorylierte Caspase-8 für alle Zellfunktionen außerhalb des Zelltodes zuständig ist – wie Zellmigration, Proliferation, usw. – während Zellen, in denen die aktive Form von Caspase-8 vorkommt, der Apoptose zugeführt werden (30) (29).

1.2.4.2 FADD

Ein weiteres wichtiges Molekül bei der Aktivierung des Zelltodes ist FADD.

Das Adapter-Molekül FADD (*Fas-associated death domain*) – auch MORT-1 genannt – spielt eine entscheidende Rolle bei der Fas-vermittelten Apoptose (36). Es ist für die Bildung

des Multiproteinkomplexes DISC (*death-inducing signaling complex*) und damit für die Verknüpfung des Todesrezeptors mit der Initiatorcaspase-8 verantwortlich (37). Das FADD-Molekül ist ca. 22 kDa groß, 208 Aminosäuren lang und wird in allen Geweben exprimiert (38) (39). Über die homologen Regionen, die Todesdomänen genannt werden, agiert es mit anderen Proteinen (8) (40); es enthält eine *Death-Effector-Domain* (DED) und eine *Death-Domain* (DD) (13) (41). Mit Hilfe dieser Domänen hat es die Aufgabe, Caspase-8 und -10 und weitere Effektorproteine mit dem Todesrezeptor zu verbinden (19) (41). FADD ist selbst aber nicht enzymatisch aktiv (35) (22). Der Aktivierungsvorgang ist sehr komplex und läuft folgendermaßen ab: bindet ein extrazellulärer Stimulus, wie z.B. Fas, an den Todesrezeptor, kommt es innerhalb weniger Sekunden zur Bildung des Signalkomplexes DISC an der inneren Plasmamembran (19) (42).

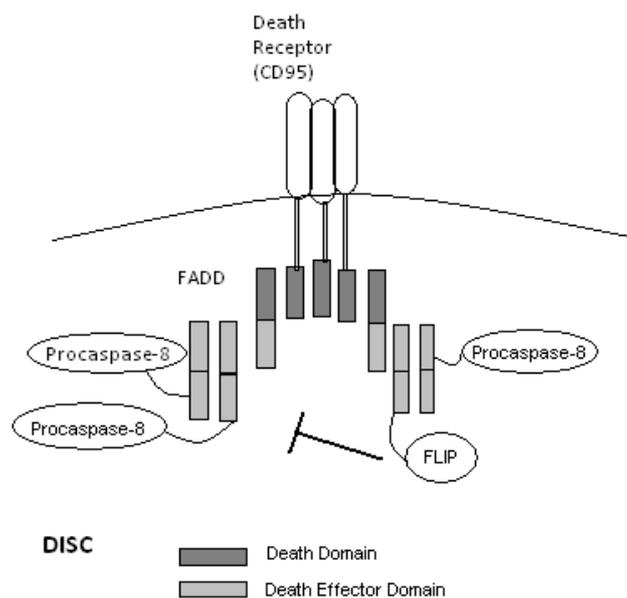


Abb. 3 DISC (22) (43)

Bindet Fas an den Todesrezeptor, rekrutiert es FADD über die *Death Domain*. FADD wiederum bindet über die *Death Effector Domain* an Caspase-8 und FLIP. Durch Bildung eines Homodimers wird Caspase-8 aktiviert.

Zunächst bindet Fas an FADD über eine Todesrezeptor-Todesrezeptor-Interaktion (13); dies geschieht, indem FADD die am carboxyterminalen Ende gelegene DD an die DD des Rezeptors bindet und dadurch die noch freie, aminotermale DED exponiert (44). Diese

Domäne von FADD interagiert dann mit der Prodomäne von Procaspase-8, die ebenfalls zwei Kopien der DED enthält (19).

Die Todesdomänen haben keine enzymatische Funktion, aber sie verknüpfen die verschiedenen Proteine miteinander (35). So werden auch drei Procaspase-8-Moleküle miteinander in Verbindung gebracht; die räumliche Nähe der Caspase-8-Moleküle zueinander führt über einen noch unbekanntem Mechanismus – am ehesten aber wohl durch proteolytische Spaltung – zu ihrer eigenen Aktivierung (19) (11) (28) und darüber letztendlich zur Caspase-3-Aktivierung (13). Der Schritt der Caspase-8-Aktivierung ist bedeutend für den Beginn und den weiteren Ablauf des Zelltodes (11). Die Aktivierungsplattform DISC hat für Caspase-8 und -10 eine ähnliche Funktion wie das Apoptosom für Caspase 9 (15).

Neben FADD enthält der DISC noch weitere Adaptermoleküle, wie z.B. TRADD, DAXX, RAIDD, die RIP-Kinase und FLIP (11). Fas kann außer mit FADD ebenso mit DAXX interagieren; dann wird die ASK-1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) aktiviert und daraus folgend der JNK- und p38 MAPK-Signalweg induziert (13).

Wie bei Caspase-8 wurden auch Experimente mit Mäusen durchgeführt, die kein FADD besaßen oder bilden konnten (22). In der Embryonalzeit wurden Fehler bei der kardialen Entwicklung und Blutungen festgestellt, zum Teil starben die Embryonen bereits nach 10,5 Tagen (38). Bei den Überlebenden zeigte sich eine verminderte Anzahl an Zellen des Thymus und eine Blockierung der B- und T-Zell-Entwicklung und -Proliferation (11) (22). Zusätzlich deuteten die Versuchsergebnisse darauf hin, dass FADD ebenso an der Proliferation der Fibroblasten beteiligt und sogar generell ein wichtiger Regulator der Proliferation sein muss (22). Es gibt sogar noch weitere nicht-apoptotische Prozesse, bei denen eine Beteiligung von FADD vermutet wird: dazu zählen Hämatopoese, Entwicklung des angeborenen Immunsystems (38), Zellwachstum und Differenzierung (40).

FADD kann außerdem als Tumorsuppressor agieren, denn bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie war die Expression von FADD stark reduziert oder gar verschwunden (45). Es ist denkbar, dass eine fehlende FADD-Expression Tumorzellen erlauben kann, den Zelltod zu umgehen (22). In einer Versuchsreihe wurden kolorektale Adenokarzinomzellen mit FADD stabil transfiziert; FADD war dadurch überexprimiert (36). Dann wurde 5-Fluorouracil – ein potenter Inhibitor der Thymidin-Synthese und häufig verwendetes Chemotherapeutikum bei kolorektalen Karzinomen – verabreicht (36). Der Apoptose-induzierende Effekt von 5-Fluorouracil konnte durch die erhöhte FADD-Menge deutlich

verstärkt werden (36). Somit wird vermutet, dass die Expressionssteigerung von FADD Zellen für eine Chemotherapie sensitivieren kann (36).

Stimuliert man die Apoptose durch TNF α /ActD, kann man eine erhöhte Expression von FADD messen (46). Tritt FADD in sehr großen Mengen auf, kann es sogar selbst den Apoptose-Signalweg aktivieren, auch wenn gar kein Ligand an den Todesrezeptor bindet (36) (46).

Lange wurde angenommen, dass FADD nur im Zytoplasma vorkommt; allerdings konnte nun gezeigt werden, dass FADD eine NLS (*nuclear localization sequence*) hat und in den Kern translozieren kann (47) (48). Die nukleäre Funktion ist aber noch unklar, es ist möglich, dass es für die Zerstörung der DNA während der Apoptose mit verantwortlich ist (22).

1.2.4.3 Phosphoryliertes FADD

FADD kann posttranslational modifiziert werden, dazu zählt die Phosphorylierung von FADD am Ser194 bei Menschen und an Ser191 bei Mäusen (46).

Es wird vermutet, dass pFADD während der Apoptose zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her wandern kann (46). Dafür verantwortlich ist das Protein Exportin-5 (48). pFADD hält sich aber dennoch meist im Nukleus auf und ist monomer, wohingegen das im Zytoplasma vorkommende FADD auch als Dimer vorliegen kann (46).

Überwiegend während der G2/M-Phase des Zellzyklus ist FADD am Serin194 seines C-terminalen Endes phosphoryliert (49) (39). Während der G1/S-Phase bleibt es in seinem Normalzustand (49) (39). Somit zeigt sich, dass der Phosphorylierungszustand von FADD mit dem Fortschreiten des Zellzyklus zusammenhängt (50). Es wird beschrieben, dass phosphoryliertes FADD während der Mitose den Zellzyklus kontrollieren (22) und sogar zu Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase führen kann (44) (51). Interessant ist zudem die These, dass abhängig von der Phosphorylierung von FADD am Ser194 die Sensitivität eines Tumors für Chemotherapeutika festgesetzt werden könnte (52).

Es wurden zwei Kinasen identifiziert, die FADD phosphorylieren können: die FIST/HIPK3 (*Fas-interacting serine/threonine kinase/homeodomain-interacting protein kinase*) und die CKI α (*Casein kinase Ia*) (50) (52). Sowohl phosphoryliertes, als auch unphosphoryliertes FADD können in den DISC mit eingebaut werden (49).

Eine Stimulation der Zelle mit TNF α /ActD hat zwar eine Steigerung der Expression von FADD, aber eine Konzentrationsabnahme von phosphoryliertem FADD im Nukleus zur Folge (46). Bei Patienten mit einem aggressiven Lungen-Karzinom konnte vermehrt phosphoryliertes FADD und hohe Mengen an FADD im Zellkern nachgewiesen werden (53).

Des Weiteren konnte in dieser Studie auch gezeigt werden, dass p-FADD die NF- κ B-Aktivierung erheblich steigern kann und somit die Zellproliferation zunimmt (53). Es lässt sich also daraus schließen, dass phosphoryliertes FADD eine wichtige Rolle im Verhalten von aggressiven Tumoren spielt, indem es den NF- κ B-Signalweg moduliert (22). Im Gegensatz dazu ist bei akuter myeloischer Leukämie das Fehlen oder eine nur geringe Expression von pFADD ein schlechter prognostischer Faktor (53). Die Bedeutung von pFADD und FADD in malignen Zellen scheint somit noch nicht eindeutig geklärt. Es ist möglich, dass eine gesteigerte Expression von pFADD und die Lokalisierung von FADD im Nukleus mit einem Anstieg der NF- κ B-Aktivität und mit einem schlechten klinischen Outcome korreliert (54). Die Menge an phosphoryliertem FADD könnte folglich als prognostischer Biomarker in Erwägung gezogen werden (54). Dennoch bleibt diese These bei kontroversen Versuchsergebnissen weiterhin nicht eindeutig bewiesen.

1.2.4.4 FLIP

Nach Caspase-8, FADD und pFADD soll nun noch auf das Apoptose-Molekül FLIP näher eingegangen werden.

FLIP (*FLICE-inhibitory-protein*) ist ein wichtiges Regulator-Protein in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose. Es spielt vor allem bei der Caspase-8-Aktivierung und Inhibierung eine wichtige Rolle (11). FLIP hat keine proteolytische Aktivität (15) und ist ein Protein mit nur sehr kurzer Halbwertszeit (43). Entdeckt wurde FLIP zunächst als virales Inhibitorprotein, bei MCV, HHV8 oder HVS (42). Man erkannte, dass v-FLIP die Rekrutierung von Caspase-8 und die Bildung des DISC unterdrücken kann (42) (55). Beim Menschen wird es als *cellular-FLIP* (c-FLIP) bezeichnet und es existieren eine kurze und eine lange Spleiß-Variante (11). Welche der beiden produziert wird, hängt davon ab, ob Exon 7 mit eingeschlossen wird oder nicht (56). Die kurze Form c-FLIP_S besteht aus zwei DEDs, über die FLIP an FADD binden kann; die lange Form besitzt zusätzlich eine pseudokatalytische Caspase-Domäne, allerdings ohne die aktive Cysteinregion (11) (35). FLIP_L zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Caspase-8 (57). Beide können mit dem Adapterprotein FADD und der Protease FLICE interagieren (58). Seit kurzem ist allerdings noch eine weitere Isoform bekannt, die in Raji-Zellen (Burkitt-Lymphom-Zellen) entdeckt wurde, das c-FLIP_R (56) (59). Dieses Protein ist FLIP_S in der Struktur sehr ähnlich, sie unterscheiden sich auch nicht in ihrem antiapoptotischen Potential (60). FLIP_S scheint im Laufe der Evolution erst viel später entstanden zu sein, es wurde bisher auch nur beim Menschen entdeckt (56). Ob der

Organismus FLIP_R oder FLIP_S bildet, ist einzig von einem Nucleotid-Polymorphismus im FLIP-Gen abhängig (56). Allerdings wird FLIP_S wesentlich stärker exprimiert als FLIP_R (56). c-FLIP_S – und auch c-FLIP_R – sind Inhibitoren der Apoptose (15). Sie verhindern die am Fas-, TNFR1- oder TRAIL-Rezeptor hervorgerufene Apoptose, indem sie sich an die DED von FADD hängen und diese dadurch für die Procaspase-8 blockieren oder aber mit Procaspase-8 um diesen Platz wetteifern (15) (35). c-FLIP inhibiert somit die Aktivierung von Caspase-8 durch FADD (13). Hohe Mengen an kurzem FLIP sind daher oft mit der Entstehung von Krebs assoziiert, da der Zelltod über den Todesrezeptor-Signalweg gestoppt werden kann (41).

Dagegen nimmt c-FLIP_L eine Sonderstellung ein. Abhängig von seinem Expressionslevel kann es sowohl als Inhibitor oder auch als Aktivator des extrinsischen Signalweges fungieren (15) (61). Wenn c-FLIP_L in physiologischen und somit eher geringen Mengen vorkommt, fördert es die Apoptose und ist ein potenter Aktivator von Caspase-8 (15) (35). Es wird im DISC verstärkt angereichert und kann dort den Vorgang der Caspase-8-Aktivierung durch Hetero-Dimerisierung katalysieren (22) (61). Dabei hat das Caspase-8-cFLIP_L-Heterodimer sogar eine größere Affinität zum CD95-FADD-Komplex, als das Caspase-8-Homodimer (62). FLIP vermittelt seinen proapoptotischen Effekt über die Protease-ähnliche Domäne (61). Die aktivierte Caspase-8 wiederum kann FLIP_L schneiden (62). Bei einem starken Anstieg der ektopen c-FLIP_L-Expression wird FLIP zum Apoptoseinhibitor (61). Dabei kann es sogar den durch Chemotherapeutika induzierten Zelltod verhindern (63). Tritt es in extrem hohen, unphysiologischen Mengen auf, wirkt c-FLIP_L zytotoxisch und kann sogar von sich aus den Apoptosevorgang aktivieren (61).

Sind FLIP_L und FLIP_S beide überexprimiert, können sie den Apoptosevorgang erheblich unterdrücken, wenn die Apoptose über die Todesrezeptoren begonnen wird (35) (22). Dabei wird vor allem die vollständige Caspase-8-Aktivierung blockiert (61). Nukleäres NF-κB kann die c-FLIP-Expression im Rahmen seines antiapoptotischen Programmes steigern und so das Überleben der Zelle sichern (35). Umgekehrt kann FLIP den NF-κB- und den Erk-Signalweg aktivieren (57). Tierversuche zeigten, dass bei einer Zerstörung von c-FLIP in T-Zellen von Mäusen die Interleukin-2 Produktion stark abnahm (22).

Die beiden FLIP-Spleißvarianten sind aber nicht immer koreguliert (61). Die lange Variante scheint sogar ein besserer Inhibitor zu sein als FLIP_S (58).

FLIP wird vor allem in Muskelzellen, im Herzen und in lymphatischem Gewebe, aber auch vielen anderen Zellen exprimiert (58). FLIP_L hat eine molekulare Masse von ca. 55 kDa, FLIP_S und FLIP_R sind ca. 28 kDa schwer (58). Das Gen, das c-FLIP kodiert, ist mit dem

Caspase-8 und -10-Gen eng miteinander verbunden (35). Weitere Bezeichnungen für FLIP sind CFLAR (*caspase-8 and FADD-like apoptosis regulator*), I-FLICE (*inhibitor of FLICE*), CASPER (*caspase-eight-related protein*), FLAME1 (*FADD-like antiapoptotic molecule 1*), CASH (*caspase homolog*), CLARP (*caspase-like apoptosis regulatory protein*) oder MRIT (*MACH-related inducer of toxicity*) (13) (64).

FLIP ist in Krebszellen häufig mit verstärkter Expression zu finden und oft für die Resistenz der Tumorzellen gegenüber dem Fas-Liganden oder TRAIL verantwortlich (59) (61). Dazu zählen vor allem kolorektale Karzinome, Pankreaskarzinom, Hodgkin-Lymphom, Melanom, Ovarialkarzinom, Zervixkarzinom und Prostatakarzinom (59). Konnte in Versuchen die c-FLIP-Konzentration künstlich gesenkt werden, zeigte sich eine verbesserte Sensitivität der Zellen für Todesstimuli (59). Dies ist ein interessanter Aspekt für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden bei Tumorpatienten.

Neben der Apoptose-Modulation übernimmt FLIP aber auch noch weitere zelluläre Funktionen. So ist es an der Zellmigration beteiligt, z.B. indem es bei HeLa-Zellen die fokale Adhäsionskinase aktiviert (22). Außerdem hat es eine wichtige Aufgabe in der Homöostase von T- und B-Zellen (56).

Caspase-8, FADD, pFADD und FLIP sind somit vielfältige und bedeutende Proteine für den Ablauf des extrinsischen Apoptose-Signalweges.

1.3 Tumorgenese

Proliferieren im Organismus Zellen ungebremst und werden dabei zu wenige Zellen apoptotisch, deren Genom noch dazu z.B. durch chemische oder physikalische Kanzerogene verändert ist, kann Krebs entstehen (25) (65). Die Tumorgenese ist ein komplexer Prozess, der mit Entartung körpereigener Zellen durch Störungen der normalen Regulation der Proliferationsfähigkeit einhergeht (66). Zu den genetischen Veränderungen gehören beispielsweise Punktmutation, Deregulation oder Deletion eines Protoonkogens, Anti-Onkogens oder Wachstumsfaktors (36). Entscheidend bei der Krebsentstehung ist die Tatsache, dass Tumorzellen gegen Apoptose oft resistent sind (25), bzw. dass sie unfähig sind, auf apoptotische Stimuli mit dem Zelltod zu reagieren (30). Krebszellen infiltrieren und zerstören ihre Umgebung und können Metastasen im ganzen Körper bilden (66). Das Gleichgewicht von Wachstum und Differenzierung ist gestört (66).

1.3.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Um eine ungebremste Krebsentstehung zu verhindern, unterliegen Wachstum, Differenzierung und Zelltod komplexen Regulationsmechanismen (67). Dazu gehören auch Antionkogene, die den Zellzyklus an verschiedenen Stellen anhalten können (66). Werden Fehler am Erbgut der Zelle festgestellt, werden diese entweder repariert oder die Zelle wird apoptotisch (66). Die wohl bekanntesten Antionkogene – oder auch Tumorsuppressorgene genannt – sind p53 und das Retinoblastomprotein pRb (66) (68). pRb kann die für den Übergang in die Synthese-Phase des Zellzyklus benötigten Transkriptionsfaktoren binden und inaktivieren (66). Erst wenn pRB phosphoryliert und somit inaktiviert wird, können die Faktoren freigesetzt werden und der Zellzyklus läuft weiter (66) (69). P53 – der Wächter des Genoms – hemmt mit Hilfe von Mediatoren, z.B. p21, den Übergang in die S-Phase bei DNA-Schäden und kann proapoptotische Signale aktivieren (66) (70).

Eine wichtige Entdeckung in der Krebsforschung ist die Tatsache, dass in Krebszellen Mutationen stattfinden, die zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen und gleichzeitig zu einem Funktionsgewinn von Onkogenen führen (71) (72). Tumorsuppressorgene entfallen somit als Kontrollelemente und es resultiert eine gesteigerte Proliferationsrate, die Wachstumsregulation ist ganz oder teilweise aufgehoben (69). Protoonkogene sind für das physiologische Zellwachstum benötigte Gene. Die in Tumoren vermehrt aktiven Onkogene fördern als zelluläre Onkogene Tumorstadium (66). Des Weiteren gibt es virale Onkogene, die zur permanenten Aktivierung des zur Proliferation benötigten Signalweges führen (66). Die Veränderungen der an der Wachstumsregulation beteiligten Faktoren entwickeln sich aber meist über einen langen Zeitraum (71). Zudem zeigt sich mit steigendem Alter eine erhöhte Inzidenz für das Auftreten bösartiger Erkrankungen (71). Etwa alle 10^{14} Zellteilungen entsteht eine Krebszelle, zur Erkrankung kommt es bei jedem Dritten (65).

1.3.2 Zellphysiologische Eigenschaften von Karzinomzellen

Im Vergleich zu gesunden Zellen werden Karzinomzellen sechs entscheidende, zellphysiologische Eigenschaften zugesprochen, die ihr ungebremstes Wachstum erleichtern: dazu zählen selbstständige Bildung oder Expressionssteigerung von Wachstumsfaktoren, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Umgehen der Apoptose, grenzenloses Replikationsvermögen, selbstinduzierte Angiogenese und Invasion anderer Gewebe bzw. Metastasierung (71). Diese Veränderungen haben sich beinahe alle Krebszellen angeeignet, während sie den zahlreichen Kontrollmechanismen des Organismus entkommen sind (71).

Normalerweise benötigt eine Zelle Wachstumssignale vom Nachbargewebe oder über endokrine Mediatoren, um proliferieren und in den Zellzyklus eintreten zu können (71). Tumorzellen jedoch können ihre eigenen Signale generieren und dadurch ihre Abhängigkeit von der Umgebung reduzieren (71). Sie entwickeln verschiedene Strategien, um einen terminal differenzierten Zustand zu umgehen, z.B. durch gesteigerte Expression des Onkogens c-myc, das einen Transkriptionsfaktor kodiert (65).

Apoptoseresistenz ist ebenso eine sehr wichtige Eigenschaft für Tumoren. In weit über 50% der menschlichen Krebsarten wurde diese durch Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 erreicht (70) (73) (74). Die Inaktivierung von p53 bietet den Krebszellen die Möglichkeit, den intrinsischen Signalweg zu umgehen (74). Daher ist es mitunter Gegenstand der aktuellen Forschung, p53 wieder aktivieren zu können oder negative Regulatoren zu inhibieren (65). Gesunde Zellen können nur etwa 60-70 mal den Teilungsprozess durchlaufen (71). Dafür verantwortlich sind die Telomere, die das Chromosomenende bilden (75). Bei jeder Zellteilung geht ein Stück der vielen TTAGGG-Repeats verloren, das die DNA-Polymerase nicht replizieren kann (75) (76). Maligne Zellen hingegen besitzen die Fähigkeit, die Verkürzung ihrer Telomere durch das Telomerase-Enzym zu verhindern und somit unbegrenzte Zellteilung zu ermöglichen (67) (71). Dies ist ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten (68).

Des Weiteren können Tumorzellen Einfluss auf Angiogenese-hemmende (z.B. Thrombospondin-1) und -fördernde (z.B. VEGF, FGF1/2) Faktoren nehmen und deren Expression zu ihrem Vorteil regulieren (71). Dadurch können Tumorzellen dann auch in andere Gewebe metastasieren, ohne von den umgebenden Zellen abhängig zu sein und an Orte wandern, an denen Platz und Ernährung nicht limitiert sind (71). Normalerweise können Zellen in der Blutbahn und ohne angemessene Umgebung nicht überleben (68) (72); bei metastasierten Zellen findet man dafür allerdings Expressionsänderungen in Zell-Adhäsionsmolekülen (CAMs, z.B. E-cadherin) und extrazellulären Proteasen (71).

1.3.3 Therapieansätze

Die meisten Therapieformen – v.a. die Chemotherapie – versuchen Krebszellen zu töten, indem der intrinsische Apoptosesignalweg aktiviert wird (68). Aber Defekte im programmierten Zelltod können zu einer Resistenz gegenüber zytotoxischen Therapien führen (25). Aktuelle Ansätze in der Krebstherapie bestehen dennoch darin, Tumorzellen apoptotisch werden zu lassen und die erworbenen Resistenzmechanismen zu umgehen (25). Im Zentrum der Forschung stehen dabei inhibitorische Apoptose-Proteine (IAPs), die die Caspase-

Funktion endogen unterdrücken können und dadurch das Ansprechen auf Therapien erschweren und eine weitaus schlechtere Prognose bewirken (25) (77) (73). Erste Experimente befassten sich dabei mit der Entwicklung von XIAP (*X chromosome-linked IAP*) Antisense-Oligonucleotiden; es zeigte sich weniger Tumoraktivität, die Zellen sprachen auf Bestrahlung, Chemotherapie und TRAIL-induzierten Zelltod viel besser an (25). Zudem sind einige endogene Proteine bekannt, die IAP antagonisieren können (25). Dazu zählen Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 und XAF1 (25). XAF1 ist ein nukleäres Protein, das XIAP antagonisieren kann, indem es dieses im Kern bindet (78). Es wird unter anderem bei Darmkrebs als Tumorsuppressorgen angesehen (25).

Manche Tumorzelltypen sind für die TRAIL-*(tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing-ligand)* induzierte Apoptose sensibel (79). Daher könnte der Apo2L/TRAIL-Signalweg für die Weiterentwicklung von Krebstherapien an Bedeutung gewinnen (74). TRAIL ist dem Aufbau von FasL oder anderen TNF-verwandten Proteinen sehr ähnlich; es ist ein vielversprechendes Agens bei der Bekämpfung von Tumorzellen (79) (80). Auch die Stimulation des Rezeptors mit TRAIL vermittelt die Bildung des DISC, allerdings können sich z.B. durch Mutationen von FADD oder Caspase-8 Resistenzen gegenüber dem TRAIL-Signal bilden (79) (80).

1.3.4 Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms

Bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms gibt es einige Besonderheiten im Vergleich zu anderen Tumoren:

Das kolorektale Karzinom ist die Konsequenz mehrerer genetischer (z.B. Genmutationen, Genamplifikationen) und epigenetischer (z.B. Chromatinmodifikationen, atypische DNA-Methylierungen) Veränderungen, die Darmepithelzellen zu Adenokarzinom-Zellen transformieren und zu einer atypischen Methylierung von Tumorsuppressorgen führen (76). Vorherrschend sind dabei die Mikrosatelliteninstabilität mit einem Auftreten bei ca. 20% aller Kolonkarzinomzellen und die Chromosomeninstabilität mit ca. 85% (76). Auch zahlreiche Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, sind davon betroffen (76). Die genomischen Veränderungen treten im Prozess der Tumorentstehung sehr früh auf (76). Dennoch steht zu Beginn der kolorektalen Karzinogenese die Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgens, gefolgt von Mutationen im Onkogen K-ras und im Tumorsuppressorgen p53 (81). Da APC mit dem Protoonkogen β -catenin interagiert, wurde ein Zusammenhang der Darmkrebsentstehung mit dem Wnt/ β -catenin/TCF-Signalweg postuliert (81). Tatsächlich sind bei 70-80% der kolorektalen Karzinome Defekte im Wnt-Signalweg

nachweisbar bzw. APC ist dort nicht aktiv (81). Der Wnt-Signalweg hat eine wichtige Funktion bei der Zellentwicklung und der Gewebshomöostase (81). APC ist dafür verantwortlich, das freie β -catenin zusammen mit der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β und mit Axin-Proteinen zu regulieren (81). Kommt es zum Verlust der APC-Funktion, der Inaktivierung von Axin oder der verstärkten Aktivierung von β -catenin, resultiert eine zelluläre Anhäufung von β -catenin (81). Daraufhin werden Gene wie z.B. c-myc, cyclin D1 oder ITF-2 Tcf-abhängig vermehrt exprimiert, der Wnt-Signalweg wird inaktiviert (67) (81). APC ist hauptsächlich bei der familiären adenomatösen Polyposis mutiert, kann aber auch bei sporadisch auftretenden Tumoren verändert sein (67).

Auch die unregelmäßige Expression oder Funktion von Caspase-8 durch Mutationen wurde im kolorektalen Karzinom gefunden und kann die Entwicklung, das Fortschreiten und die Behandlungsresistenz des Tumors fördern (30). Deswegen wurden bereits mehrere Strategien entwickelt, um die Caspase-8-Expression bei Tumorpatienten wieder zu steigern, dazu zählen demethylierende Agenzien und Interferon (30).

Bcl-2, einer der relevantesten Apoptoseinhibitoren, wird beim kolorektalen Karzinom verstärkt exprimiert (82). Survivin ist ein neuentdecktes antiapoptotisches Gen, das vor allem in Darmkrebszellen gefunden wurde (82). Die Co-Expression von Bcl-2 und Survivin ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (82). Außerdem wurde kürzlich ein Gen identifiziert, das Hinweise über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Metastasen beim Kolonkarzinom geben könnte (83). Ist die Aktivität dieses MACC1-Gens erniedrigt, scheint das Metastasierungsrisiko geringer und damit die Lebenserwartung erhöht (83).

Zudem ist bei metastasierten kolorektalen Karzinomen zu 70% eine EGFR-Expression nachgewiesen und mit einer schlechteren Prognose verbunden. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR ist ein Transmembranprotein und reguliert Prozesse wie Proliferation, Migration, Invasion, Angiogenese und Apoptose. (65).

1.4 Tumorsuppressorgenkandidat DRO1

Eine besondere Bedeutung für das Verständnis der kolorektalen Karzinogenese und dessen Behandlungsoptionen könnte die Entdeckung des Tumorsuppressorgenkandidaten DRO1 haben:

Die Transformation normaler Epithelzellen durch Onkogene resultiert aus grundlegenden Veränderungen im transkriptionellen Programm einer Zelle. Der Wnt-/APC/ β -catenin/TCF-Signalweg ist, wie bereits erwähnt, davon häufig betroffen (84). Deshalb sollten neben Genen,

die durch β -catenin aktiviert werden, in einem Experiment vor allem Gene untersucht werden, deren Vorhandensein durch β -catenin erheblich gesenkt wird (84). Dabei wurde ein Gen entdeckt, das in β -catenin transformierten RK3E-Zellen nur schwach exprimiert wurde (84). Da diese Expressionsabnahme nicht nur bei Zellen, die mit β -catenin transfiziert wurden, zu sehen war, sondern auch in RK3E-Zellen mit den Onkogenen Ras, GLI oder c-Myc und vor allem in Kolonkarzinomzelllinien wurde das Gen *Down-regulated by oncogenes 1* (DRO1) genannt (84).

Dieses Gen konnte bisher sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte isoliert werden (84). Beim Menschen wird es vor allem in der Mukosa des Darmes, im Kolonepithel und im Pankreas exprimiert, bei der Ratte wurde es in Lunge, Pankreas, Haut, Fett und Hoden nachgewiesen (84). DRO1 wird besonders in epithelialen Geweben exprimiert, die häufig von neoplastischen Transformationen betroffen sind und bei denen überwiegend der Wnt- und Ras/Raf- Signalweg dereguliert ist (84).

Das DRO1-Protein ist ein 109 kDa großes Molekül und besteht aus 951 Aminosäuren (84). Als exprimiertes HA-immunoreaktives Protein ist es 130 kDa groß (84). Das Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 3q13.2 lokalisiert (84). Durch Immunofluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass DRO1 hauptsächlich im Zytosol und nur geringfügig im Endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat zu finden ist (84). DRO1 wird posttranslational durch N-Glykosylierung modifiziert, deshalb ist anzunehmen, dass es zum Teil im Endoplasmatischen Reticulum hergestellt oder bearbeitet wird (84).

Nach der Sequenzierung von DRO1 konnte dessen Aufbau genauer beschrieben werden: DRO1 enthält ein Signal-Peptid und besitzt drei repetitive Sequenzen, die *Internal Repeats*, die aus je 142-147 Aminosäuren aufgebaut sind (84).

Eine wichtige Entdeckung ist die Tatsache, dass DRO1 im Aufbau der *Internal Repeats* eine große Ähnlichkeit zu dem Tumorsuppressorgen DRS (*DRS/SRPX/ETX1 – down-regulated by src/Sushi-repeat Protein on the X-chromosome*) zeigt (84).

DRS wurde entdeckt, als eine stark unterdrückte Expression von DRS nach neoplastischer Transformation von Fibroblasten nachgewiesen wurde, die durch verschiedene Onkogene wie z.B. v-src und v-K-ras hervorgerufen wird (84) (85). Außerdem ist DRS bei malignen Veränderungen von Kolon, Harnblase, Ovar, Lunge und Prostata nur in geringen Mengen nachweisbar, in gesundem Gewebe aber stark exprimiert (85) (86) (87) (88). Bei kolorektalen Adenomen mit milden Atypiezeichen konnte eine signifikante Expression von DRS-mRNA gefunden werden, wohingegen bei Adenomen mit moderater Atypie und fokalem Karzinom

die Expression stark reduziert war (86). Dies legt eine Korrelation der erniedrigten Expression von DRS mit der Entwicklung eines kolorektalen Adenokarzinoms nahe.

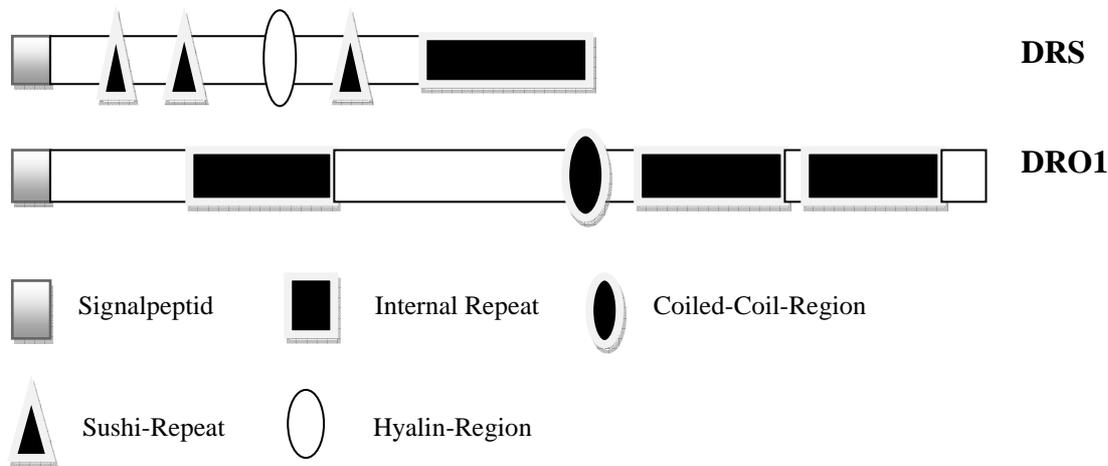


Abb. 4 Schematische Darstellung der Struktur von DRS und DRO1 beim Menschen (84)

Beide Moleküle besitzen ein Signalpeptid. Das Internal Repeat von DRS/SRPX/ETX1 findet sich dreimal in DRO1 wieder.

Die drei *Internal Repeats* von DRO1 sind der carboxy-terminalen Region von DRS sehr ähnlich (84). Jedes der *DRO1-Repeats* stimmt zu circa 30% mit der carboxy-terminalen DRS-Region überein (84). Das carboxy-terminale DRS-Stück enthält eine transmembranöse Region (86) (88). Da die *Repeats* in DRO1 die am meisten konservierten Bereiche sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie aufgrund der Ähnlichkeit zu DRS eine funktionell sehr wichtige Region darstellen (84).

Experimente mit Deletionskonstrukten von DRS zeigten, dass die *Sushi-Repeats* und das *Internal Repeat* die entscheidende Region für die Funktion des Tumorsuppressor sind und auch alle drei *Sushi-Repeats* benötigt werden (89) (90). Tumorentstehung kann DRS verhindern, indem es die Aktivität von Caspase-12, -9, und 3 steigert (89).

DRO1 ist zudem strukturell sehr ähnlich aufgebaut wie Equarin-L und URB (*up-regulated in bombesin receptor sub-type-3 deficient mouse*), das bei Mäusen gefunden wurde, so dass es sich bei DRO1, URB und Equarin wahrscheinlich um das gleiche Molekül handelt (84) (91). URB wurde in verschiedenen Organen nachgewiesen: Bei Mensch und Ratte ist es vermehrt im weißen Fettgewebe zu finden, scheint aber bei Übergewicht und bei metabolischem Syndrom reduziert zu sein (91). Während der osteoblastischen Differenzierung von Zellen im Knochenmark ist die Expression von URB erniedrigt (92). Außerdem wurde entdeckt, dass URB in Hautpapillen stark exprimiert wird und nach Stimulation mit Androgenen das

Haarwachstum fördern kann (93). Große Mengen sind in Herz, Pankreas, Muskel, Thymus und Dünndarm vorhanden, schwächer exprimiert wird URB in Plazenta und Milz, gar nicht nachgewiesen wurde es im Gehirn, Niere, Leber und Lunge (92). Aber wie für DRO1 scheint auch URB eine Rolle bei der Apoptosevermittlung von Tumorzellen zu spielen (91).

Das CL2-Gen, dessen Expression beim Menschen in neoplastischem Schilddrüsengewebe und beim Ovarialkarzinom stark erniedrigt ist, aber auch in vielen anderen Geweben zu finden ist, ist neben DRO1, DRS und Equarin das vierte Homolog zu URB (94). Es stimmt zu 84% mit URB überein (92). CL2 kodiert 949 Aminosäuren und enthält drei Domänen; zusätzlich besitzt es ein Signalpeptid und mehrere NLS (*nuclear localization signals*) (94). Auch diesem Gen werden die Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens zugeschrieben (94).

Die hochkonservierten Regionen von CL2/URB/Equarin-L sind noch einem weiteren Verwandten von DRS sehr ähnlich, das als Zielgen des promyelozytischen Leukämiefusionsprotein E2A-HLF kloniert wurde und als SRPUL (*sushi repeat protein up-regulated in leukemia*) bezeichnet wird (84). Somit könnte man alle Moleküle, die dieses *Repeat* enthalten und auch funktionell verwandt sind, zu einer neuen Proteinfamilie mit dem sogenannten *DUDES-Repeat* (DRO1-URB-DRS-equarin-SRPUL) zusammenfassen (84).

Auch das erst vor kurzem beschriebene Protein Ccdc80 (*coiled-coil domain containing 80*) ist als Homolog von DRO1 und URB anzusehen (95). Ccdc80 wird für die Inhibition der T-Zell-Faktor-vermittelten Transkriptions-Aktivität benötigt und auch für die Verminderung der Expression von Zielgenen des Wnt/ β -catenin-Signalweges (95). Es spielt eine kritische Rolle bei der Vermittlung des Übergangs von Adipozyten-Vorstufen zu ausdifferenzierten Adipozyten und kontrolliert dabei den Wnt/ β -catenin-Signalweg (95). Außerdem kann Ccdc80 bei Überexpression die Adipozyten-Differenzierung hemmen, wird dafür aber wiederum auch benötigt; es hat also positive und negative Effekte auf die Adipogenese (95). Bei verschiedenen Krebszelllinien ist die Expression erheblich vermindert; die ektope Expression von Ccdc80 hemmt die Wachstumseigenschaften von Tumorzellen und Ccdc80 hat somit tumorsupprimierende Eigenschaften (95).

Da DRO1 ein Signalpeptid enthält, wurde auch untersucht, ob es als Protein aus der Zelle ausgeschleust wird. Allerdings konnten im Überstand nur geringfügige Mengen nachgewiesen werden und auch Antiserum gegen DRO1 brachte kein anderes Ergebnis, so dass DRO1 nicht als Sekretionsprotein angesehen wurde (84).

Die DRO1-Expression ist in Kolon- und Pankreas-Krebszellen stark unterdrückt (84). Dies zeigte ein Versuch, bei dem mehrere kolorektale und pankreatische Krebszelllinien auf DRO1 untersucht wurden (84). Somit liegt die Vermutung nahe, dass bestimmte Onkogene – direkt

oder indirekt – die DRO1-Expression vermindern können (84). Noch nicht endgültig geklärt ist, wie die Expression von DRO1 in Kolonkarzinomzellen reduziert wird. Eine direkte Regulation der DRO1-Expression durch DNA-Hypermethylierung wäre möglich, da bei Krebszelllinien, die mit Hilfe eines 5-azacytidin-Reagenz DRO1 demethyliert wurden, DRO1 geringfügig mehr nachgewiesen werden konnte (84). Vermutlich wird DRO1 jedoch transkriptionell unterdrückt (84). Es ist denkbar, dass Repressoren an den DRO1-Promoter binden und dadurch die Expression verhindern (84).

Anhand von Versuchen mit mehreren Kolonkarzinomzelllinien wurde festgestellt, dass bei Reexpression von DRO1 das Wachstum maligner Zellen reduziert werden konnte (84). Zudem stieg bei Zellen, die DRO1 enthielten und mit dem CD95-Antikörper APO stimuliert wurden, die Apoptoserate (84). DRO1 scheint somit ein vielsprechender Tumorsuppressorgenkandidat zu sein, indem es zwar das Zellwachstum oder die Apoptoseinduktion nicht direkt beeinflussen kann, aber die Zellen für apoptotische Signale sensibilisiert (84).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass DRO1 das Wachstum von Krebszellen durch Anoikis inhibieren kann (84). Als Anoikis bezeichnet man eine besondere Form der Apoptose durch Ablösung der Zellen von ihrer Umgebung. Wenn Zellen sich von den Nachbarzellen oder der Basalstroma loslösen, mit denen sie normalerweise interagieren, werden sie apoptotisch (15) (65). Der Grund dafür ist, dass sie ihre Zell-Zell-Kontakte verlieren und der Zelle somit notwendige Überlebenssignale entzogen werden, die durch Integrine und Cadherine vermittelt wurden (65). Tumorzellen haben sich aber Fähigkeiten angeeignet, mit deren Hilfe sie dieser Situation entgehen. Sie können Signale, die normalerweise Apoptose auslösen und die Zellen zerstören würden, inaktivieren (15). Somit sind der Verlust der Zellverankerung und die Anoikis kritische Schritte während der neoplastischen Transformation (84). Auch DRS führt zur Unterdrückung des Verankerungs-unabhängigen Wachstums (88) (90); Caspase-8 scheint in diese Ablösungs-induzierte Apoptose verwickelt zu sein (31).

1.5 Fragestellung

Bei der kolorektalen Karzinogenese kommt es meist zum Verlust der DRO1-Expression in den Krebszellen. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass DRO1 Tumorzellen für die APO-induzierte Apoptose sensitivieren kann.

Da dennoch viele Eigenschaften von DRO1 noch unklar sind und um die Bedeutung von DRO1 als Tumorsuppressorgenkandidat bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms

besser verstehen zu können, habe ich in meiner Promotionsarbeit folgende Fragestellungen untersucht:

1. DRO1 führt bei Kolonkarzinomzellen zu einer gesteigerten Sensitivierung für die Rezeptor-vermittelte Apoptose.

Kann DRO1 eine Veränderung der Expression verschiedener Apoptosemoleküle bewirken, um dadurch eine Steigerung der Apoptoserate zu erreichen? Über welchen Mechanismus sensitiviert DRO1 Zellen für die Apoptose?

2. Welche Strukturen und welche Domänen des DRO1-Proteins sind entscheidend für dessen Funktion als Tumorsuppressorgen und welche Genabschnitte spielen eine untergeordnete Rolle? Kann man anhand von Deletionskonstrukten und deren Transfektion in Kolonkarzinomzelllinien durch *Colony Forming Assays* eine Aussage über die Bedeutung einzelner struktureller Bereiche und vor allem über die hoch konservierten Abschnitte der *Internal Repeats* treffen?

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 PCR

Zunächst wurden die Primer (Metabion, Martinsried; Tabelle 1) für die gewünschten DRO1-Konstrukte mit DNAase/RNase freiem Wasser (GIBCO/Invitrogen, Paisley/UK) gelöst und zu einer 20µM Stock-Konzentration verdünnt. Als Vorlage diente der Vektor pGB608 mit 8312 Basenpaaren; dieser besteht aus dem mit DRO1 transfizierten Plasmid pcDNA3 (Invitrogen, Paisley/UK). Um einen einheitlichen Reaktionsansatz zu erhalten, wurde ein Mastermix erstellt (Tabelle 2).

<u>Primer: Mutante A</u>	fw	<i>DRO1_ECORI_1_FW</i>	5' GCGA GAATTC ATG ACA TGG AGA ATG GGA C 3'
	rv	<i>DRO1_NHEI_408_RV</i>	5'GACG GCTAGC GGA CCC CGA AGG GAA AC 3'
Mutante B	fw	<i>DRO1_ECORI_1_FW</i>	5' GCGA GAATTC ATG ACA TGG AGA ATG GGA C 3'
	rv	<i>DRO1-NHEI_873_RV</i>	5'GACG GCTAGC CAC CAC CTG GCC CTC TAC 3'
Mutante C	fw	<i>DRO1_ECORI_1_FW</i>	5' GCGA GAATTC ATG ACA TGG AGA ATG GGA C 3'
	rv	<i>DRO1_NHEI_2292_RV</i>	5'GACG GCTAGC CTA TTT GTC CTC TTT GCA AAC AAT GC 3'
Mutante D	fw	<i>DRO1_ECORI_2293_FW</i>	5'GCGA GAATTC ATG AAG CAG TCC CTG GAG AAC 3'
	rv	<i>DRO1_NHEI_2853_RV</i>	5'GACG GCTAGC GTA AGG GTA TCC ATG GT 3'
Mutante E	fw	<i>DRO1_ECORI_1810_FW</i>	5'GCGA GAATTC ATG TTC ACG CAG AGT CCC AAG 3'
	rv	<i>DRO1_NHEI_2853_RV</i>	5'GACG GCTAGC GTA AGG GTA TCC ATG GT 3'
Mutante F	fw	<i>DRO1_ECORI_385_FW</i>	5'GCGA GAATTC ATG TTG CGT TTC CCT TCG G 3'
	rv	<i>DRO1_NHEI_2853_RV</i>	5'GACG GCTAGC GTA AGG GTA TCC ATG GT 3'

Tabelle 1

Mastermix für 20µl Ansatz:	2 µl	10x Puffer
	0,5 µl	dNTP's (Chemicon/Millipore, Billerica)
	0,2 µl	fwPrimer
	0,2 µl	rvPrimer

	1 μ l	Plasmid-DNA pGB608 (=DRO1 in pcDNA3)
	0,5 μ l	Pfu-Polymerase
	<u>15,6 μl</u>	DNAase/RNAse freies Wasser
	20 μl	

Tabelle 2

Trotz der längeren Replikationsdauer – gegenüber der Taq-Polymerase – wurde die Pfu-Polymerase (Fermentas, Ontario) wegen der höheren Genauigkeit und der 3'-5'- Exonuclease-Aktivität (Korrekturleseaktivität) ausgewählt (96). Als Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von Plasmid-DNA erstellt.

Folgendes PCR-Programm (PCR-Gerät: DNA Engine, PTC-200, MJ Research) wurde angewendet:

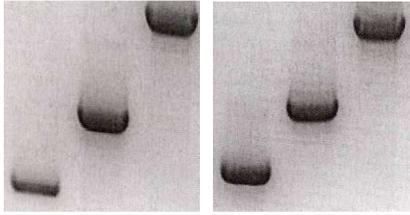
1.	95°C	3 Minuten	Aktivierung der Polymerase
2.	95°C	30 Sekunden	Auftrennen der DNA-Stränge
3.	55°C	30 Sekunden	Annealing der Primer
4.	72°C	6 Minuten	Elongation
5.	2.-4.	30 Zyklen	
6.	72°C	10 Minuten	Finale Elongation
7.	10°C		Abkühlen

Tabelle 3

2.1.2 Auftrennung von DNA-Molekülen im Agarosegel

Zur Auftrennung und Identifizierung der DNA-Fragmente wurde ein 1,5%iges Agarosegel gegossen. 1,5g Biozym LE Agarose® (Hess. Oldendorf) und 100ml TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) wurden für 4,5 Minuten bei 800 Watt in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Zur Färbung der DNA wurden 10 μ l Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) dazu gegeben. Nach Erhärten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE-Puffer aufgefüllt. 20 μ l des PCR-Produktes wurden mit 2 μ l Ladepuffer (6x Loading Dye Solution, #R0611, Fermentas, Ontario) versetzt und das gesamte Volumen in die Geltaschen gefüllt. Als Größenmarker wurden 5 μ l des GENE RULER 1kb DNA Ladder Plus® #SM1343 (Fermentas, Ontario) eingesetzt.

Bei der Agarosegel-Elektrophorese wurden für ca. 20 Minuten 120V Spannung angelegt.



Konstrukte: A B C D E F

Abb. 5 Kontrolle der Mutantengröße

Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des Markers die Größe der Konstrukte kontrolliert.

2.1.3 Gelextraktion

Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und zügig aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Aufreinigung der Gelstücke wurde das Kit NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel (Düren) verwendet und exakt nach Anleitung vorgegangen.

2.1.4 Ethanolpräzipitation von DNA-Molekülen

Um die Nukleinsäure-Lösung von Alkohol- und anderen Reaktionsresten vollständig zu reinigen, wurde nach der Gelextraktion eine Ethanolpräzipitation vorgenommen.

Dazu wurde das Volumen der Lösungen zunächst auf 100µl mit DNase/RNase freiem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden je 10µl 3M P3-Puffer (Qiagen, Hilden), 250µl Ethanol absolut (Merck, Darmstadt) und 1,25µl Glykogen (20µg/ml; #361507, Calbiochem/Merck, Darmstadt) dazu gegeben und gut vermischt. Dieser Ansatz wurde für 15 Minuten bei -20°C inkubiert und danach 15 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 300µl 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend folgte wieder fünf Minuten Zentrifugation bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Gefäß kurze Zeit offen stehen gelassen, um die DNA zu trocknen. Dann wurde die DNA in DNase/RNase freiem Wasser gelöst.

2.1.5 Anhängen von Adenosin an PCR-Produkte

Die Pfu-Polymerase fügt im Gegensatz zur Taq-Polymerase keine 3'-Adenosin-Überhänge an. Diese sind allerdings für die Ligation in einen Vektor mit Hilfe des TOPO-TA Cloning® (Invitrogen, Paisley/UK) notwendig. Somit musste im nächsten Schritt mit Hilfe der Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) ein Adenosin angehängt werden, um sogenannte „sticky ends“ zu erhalten (97).

Mastermix für 6µl Ansatz:	1 µl	Puffer
	1 µl	Hot Star Taq Polymerase
	0,2 µl	dATP (10mM)
	<u>3,8 µl</u>	DNase/RNase freies Wasser
	6 µl	

Tabelle 4

Dieser Mastermix wurde mit 4µl des aufgereinigten PCR-Produktes vermischt und für 20 Minuten im Heizblock bei 70°C inkubiert.

2.1.6 TOPO-TA-Cloning®

2.1.6.1 Ligation

Um bei der Klonierung den Anteil an Klonen mit Insert zu erhöhen, wurden die DNA-Fragmente zunächst in einen TOPO-Vektor kloniert (96). Dabei kam das Kit von Invitrogen zum Einsatz, für die Transformation wurden DH5α- Bakterien (Invitrogen, Paisley/UK) verwendet.

Ligationsansatz:	2 µl	PCR-Produkt
	1 µl	Salzlösung (im Kit enthalten)
	2 µl	DNase/RNase freies Wasser
	<u>1 µl</u>	TOPO-Vektor
	6 µl	

Tabelle 5

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

2.1.6.2 Transformation

Für die Transformation wurden zunächst 2µl des Ligationsansatzes zu den – bereits auf Eis stehenden – DH5α-Bakterien (50µl/Reaktionsgefäß) pipettiert, vorsichtig gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad, danach wurden die Eppendorf-Gefäße sofort auf das Eis zurückgestellt. Dann wurden je 250µl S.O.C. Medium (Raumtemperatur, s.2.1.6.3) zugegeben und die Proben für eine Stunde bei 37°C horizontal liegend bei 200rpm geschüttelt.

50µl des Bakteriengemisches wurden auf die Agarplatten pipettiert und mit einem Glasspatel ausgestrichen. Die Platten verblieben über Nacht umgedreht bei 37°C im Brutschrank.

2.1.6.3 S.O.C. Medium

Es wurde stets folgendes S.O.C. Medium verwendet:

SOB-Medium:	20 g	Bacto-tryptane (Difco, Lawrence)
	5 g	Bacto-yeast-extract (Invitrogen, Paisley/UK)
	0,5 g	NaCl (Roth, Karlsruhe)
	2,5 ml	1M KCl (Roth, Karlsruhe)
	Auf 1000 ml auffüllen	H ₂ O

Tabelle 6

Anschließend wurde mit NaOH der pH-Wert 7,0 eingestellt und das Medium autoklaviert.

Vor dem Aliquotieren wurden 20 ml 1M Glucoselösung (aus D(+)-Glucose, Sigma, St.Louis) zugegeben und die Aliquots bei -40°C aufbewahrt.

2.1.6.4 Agarplatten

Die für die Transformationen benötigten Agarplatten wurden wie folgt hergestellt:

12,8g LB Agar® (Lennox L Agar, Invitrogen, Paisley/UK) wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von 400ml aufgefüllt, mit Hilfe des Magnetrührers vermischt und autoklaviert. Sobald der Agar wieder abgekühlt war, wurden 400µl Ampicillin (1mg/ml) zugegeben und der Agar in die Platten gegossen.

Um Bakterienklone, die das Insert enthalten, besser zu erkennen, wurde das Blue-Withe-Screening angewendet. Dazu wurden vor Auftragen der Bakteriensuspension pro Platte 20µl X-Gal (50mg/ml, gelöst in DMSO) und 100µl IPTG (0,1 mol/l, gelöst in Wasser, Fluka, Buchs) ausgestrichen.

2.1.7 Screening der Bakterienklone

Die Bakterienklone wurden vor der Mini-Präparation mittels PCR gescreent, um möglichst nur Kolonien mit Insert weiter zu verarbeiten. Dazu wurden mit einer Pipettenspitze Bakterienklone gepickt und folgendem PCR-Ansatz zugegeben:

Mastermix für 20µl Ansatz:	2 µl	10x Puffer (5000TM, Stratagene, La Jolla)
	0,5 µl	dNTP's
	0,2 µl	T7 Primer
	0,2 µl	SP6 Primer
	0,2 µl	Paq Polymerase
	<u>16,9 µl</u>	DNase/RNAe freies Wasser
	20 µl	

Tabelle 7

Für die Positivkontrolle wurde 1µl eines Kontrollvektors eingesetzt, der Negativkontrolle wurde keine DNA zugegeben.

Als PCR-Programm wurde eingestellt:

1.	95°C	2 Minuten	Aktivierung der Polymerase
2.	95°C	20 Sekunden	Auftrennen der DNA-Stränge
3.	50°C	20 Sekunden	Annealing der Primer
4.	72°C	1 Minute	Elongation
5.	2.-4.	29 weitere Zyklen	
6.	72°C	10 Minuten	Finale Elongation
7.	10°C		Abkühlen

Tabelle 8

Zusätzlich wurden dann die Pipettenspitzen auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen und die Platte an diesen Stellen markiert und nummeriert. Die Platte wurde in den Brutschrank zurückgelegt (37°C), damit für die Weiterverarbeitung wieder diese Klone anwachsen konnten. Nach Beendigung der PCR, wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die Größe der erschienenen Fragmente mit den erwarteten Banden der Konstrukte verglichen.

2.1.8 Amplifikation und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Im nächsten Schritt wurde LB-Medium mit den – durch das PCR-Screening ausgewählten – Klonen beimpft. Dazu wurden zunächst je 4ml LB-Agar mit 4µl Ampicillin (1mg/ml) versetzt. Von der ausgestrichenen Agarplatte wurde dann der jeweilige Klon gepickt und die Pipettenspitze in das Agar-Röhrchen abgeworfen. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler (225rpm) inkubiert.

2.1.8.1 LB-Medium

8g LB Broth (Lennox L Broth Base®, Invitrogen, Paisley/UK) wurden mit Wasser bis zu einem Volumen von 400ml aufgefüllt und aufgelöst. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und nach Anbruch im Kühlschrank gelagert.

2.1.8.2 Glycerolstocks

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden noch vor der Mini-Präparation Glycerolstocks der Proben angefertigt. Dazu wurden 700µl der Tags zuvor angesetzten Bakteriensuspension (LB-Medium mit Bakterienklon) mit 300µl Glycerin 100% (Roth, Karlsruhe) versetzt, gut vermischt und bei -80°C eingefroren. Bei Bedarf konnte LB-Agar angeimpft werden ohne die Glycerolstocks auftauen zu lassen, indem mit einer Pipettenspitze leicht an der Oberfläche gekratzt wurde. Aus dem LB-Medium wurde dann wieder mit der Mini-Präparation DNA aufbereitet.

2.1.8.3 Aufreinigung der Plasmid-DNA

Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das Kit Nucleo-Spin® Plasmid von Macherey-Nagel genutzt. Dabei wurde nach Anleitung vorgegangen. Es wurden 4ml einer Bakterienkultur eingesetzt, die bei 37°C über Nacht inkubiert worden war.

2.1.8.4 Bestimmen der DNA-Konzentration

Nach der Mini-Präparation wurde die DNA-Konzentration der Proben am Photometer (Ultraspec 3100 pro, Biochrom, Berlin) bestimmt. Eine Kontrolle zum Nullabgleich enthielt 100µl DNase/RNase freies Wasser, den Proben wurden je 2µl entnommen und zu 98µl DNase/RNase freiem Wasser gegeben (Verdünnungsfaktor 50).

2.1.9 Sequenzierung

Um sicher zu stellen, dass die nun vorliegende DNA keine Fehler enthält, wurden die Proben vor der Weiterverarbeitung sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg). Dafür wurden zwischen 100 und 150 ng/µl der DNA benötigt. Das Endvolumen der abgegebenen Proben sollte 15µl betragen und zusätzlich 5mM TRIS HCl enthalten. Mit Hilfe des BLAST-Programmes (98) wurde dann das Ergebnis der Sequenzierung mit der gewünschten Sequenz verglichen und auf Mutationen untersucht.

2.1.10 Restriktionsverdau

Im nächsten Schritt mussten die gewünschten DNA-Konstrukte wieder aus dem TOPO-TA-Vektor ausgeschnitten werden, um sie in den ausgewählten Endvektor einsetzen zu können.

Nach Betrachten der Schnittstellen auf den Vektorkarten und aufgrund der günstigen Puffereigenschaften wurden die Restriktionsenzyme Nhe1 und EcoR1 ausgewählt.

Zunächst wurde ein Reaktionsansatz für Nhe1 erstellt:

Reaktionsansatz für Nhe1:	3 µg	DNA
	3 µl	10x Tango Puffer (Fermentas, Ontario)
	1 µl	Nhe1 (BioLabs, Ipswich)
	<u>(abh.von DNA-Menge)</u>	DNase/RNase freies Wasser
	30 µl	

Tabelle 9

Die Proben wurden für 4 Stunden in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurden sie 10 Minuten lang im Heizblock bei 65°C erhitzt, um Nhe1 zu inaktivieren. Nun wurde die Pufferkonzentration EcoR1 angepasst:

Reaktionsansatz für EcoR1:	12 µl	DNase/RNase freies Wasser
	7 µl	10x Tango Puffer
	<u>1 µl</u>	EcoR1 (10u/µl, #ER0271, Fermentas, Ontario)
	20 µl	

Tabelle 10

Dieser Ansatz wurde den Proben zugegeben, so dass das Endvolumen nun 50µl betrug. Das Gemisch wurde über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben mit 5µl Ladepuffer versetzt und die DNA in einem 1,5%igem Agarosegel in Rahmen (Vektor) und Insert (gewünschtes Fragment) aufgetrennt (s. 2.1.2). Das Insert wurde aus dem Gel ausgeschnitten und es folgten Gelaufreinigung (s. 2.1.3) und Ethanolpräzipitation (s. 2.1.4).

Anmerkung: Auch das Plasmid pGB608 (pcDNA3 + DRO1) wurde durch diesen Restriktionsverdau aufgeschnitten und aufgereinigt, so dass dann pcDNA3 als Rahmen für die folgende Ligation verwendet werden konnte.

2.1.11 Ligation und Transformation

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase von Fermentas verwendet (1u/ μ l, #EL0015). Auch hier wurde zunächst ein Mastermix angefertigt, dem anschließend die Inserts beigemischt wurden.

Ligationsansatz 20 μ l:	1,5 μ l	Rahmen (pcDNA3)
	8,5 μ l	Insert
	3 μ l	T4-DNA-Ligase
	2 μ l	T4-DNA-Ligase-Puffer (Fermentas, Ontario)
	<u>5 μl</u>	DNase/RNase freies Wasser
	20 μl	

Tabelle 11

Als Kontrollen wurden zum Einen statt des Inserts nur Wasser zugegeben, in der zweiten Kontrolle wurde pcDNA3 zu pGB608 religiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C gelagert.

Am nächsten Tag folgte die Transformation mit One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen, Paisley/UK). Zunächst wurden die Ligationsansätze kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Für jede Probe wurde ein Gefäß mit je 50 μ l Bakterien auf Eis gestellt, um langsam aufzutauen. Jedem Ligationsansatz wurden nun 3 μ l entnommen, zu den Bakterien pipettiert und vorsichtig durch Klopfen gegen das Gefäß gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben für 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und anschließend sofort wieder zurück auf Eis. Als nächstes wurden je 250 μ l S.O.C. Medium (Invitrogen, Paisley/UK) beigemischt. Danach wurden die Proben in einen Brutschrank gelegt (37°C), festgeklebt und bei 225rpm eine Stunde lang geschüttelt. Auf die Agarplatten (s. 2.1.6.4) wurde währenddessen je 40 μ l X-Gal (40mg/ml) pipettiert, IPTG war bei diesen Bakterien nicht notwendig (99). Je 100 μ l der Bakteriensuspensionen wurden auf den Agarplatten mit einem Glasspatel verteilt und die Platten umgedreht über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Die gewachsenen Bakterienklone wurden wie oben bereits beschrieben mit Hilfe der Paq-PCR gescreent (s. 2.1.7) und anschließend mit der Mini-Präparation aufbereitet (s. 2.1.8). Auch von diesen Klonen wurden Glycerolstocks angefertigt (s.2.1.8.2) und diese bei -80°C aufbewahrt. Die Mini-Präps wurden anschließend sequenziert und die DNA-Konzentration bestimmt. In dieser Form konnten nun die DNA-Konstrukte für gewünschten Versuche verwendet werden; sie wurden bei -40°C gelagert.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Grundlagen

2.2.1.1 Zelllinien

Für alle Experimente in der Zellkultur wurden die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HCT116 und DLD1 verwendet. Zusätzlich wurden auch HCT116- und DLD1- Zellen eingesetzt, die von der AG Kolligs bereits mit DRO1 stabil transfiziert wurden (z.B. für Apoptoseassays). Diese Zellen wurden noch in polyklonale und monoklonale HCT116/DRO1- und DLD1/DRO1-Zellen unterteilt. (Anmerkung: Die monoklonalen Zellen wurden durch eine weitere medizinische Doktorandin hergestellt und konnten für meine Versuche mit verwendet werden. Dank an Claudia Wypior)

Die Zellen wurden bis zum unmittelbaren Gebrauch bei -80°C gelagert, teilweise auch im Stickstofftank bei -196°C .

2.2.1.2 Auftauen der Zellen

Die noch gefrorenen Zellen wurden mit erwärmtem Medium (DMEM *High Glucose Medium*, PAA, mit 10% FCS: *Foetal Bovine Serum Gold*, PAA und 1% Penicillin/Streptomycin 100x, PAA, Pasching) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst und in ein mit Medium gefülltes 15ml-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Zellen fünf Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des überschüssigen Mediums wurden die Zellen in etwas Medium gelöst, je nach Pelletgröße auf ca. zwei Zellkulturschalen verteilt und die Schalen mehrmals geschwenkt.

An den folgenden Tagen wurde bei Bedarf ein Mediumwechsel durchgeführt. Bevor die Zellen für Experimente verwendet werden konnten, mussten sie mindestens einmal gesplittet werden.

Übrige Zellen wurden eingefroren.

2.2.1.3 Splitten der Zellen

Alle Zelllinien wurden nach der gleichen Vorgehensweise gesplittet:

Zunächst wurden die Zellen im Mikroskop betrachtet und Wachstum und Aussehen beurteilt. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (Dulbecco's PBS, PAA, Pasching) gewaschen, um tote Zellen und Mediumreste zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen wurden 1,5ml (für 10cm-Schalen) Trypsin-EDTA (PAA, Pasching) zugegeben und die Zellen

für wenige Minuten zurück in den Brutschrank gelegt (37°C), bis sie unter dem Mikroskop kugelig erschienen. Mit einer Pipette wurden die Zellen von der Platte abgespült und in ein mit Medium gefülltes 15ml Gefäß überführt. Sollte eine festgesetzte Menge an Zellen wieder ausgesät werden, wurden für die Zellzählung 10µl der Suspension entnommen und zwischen Zählkammer und Deckgläschen pipettiert. Dann wurde das Reaktionsgefäß fünf Minuten bei 13000rpm Zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in neuem Medium gelöst. Abhängig von der beim Aussäen gewünschten Zellzahl wurde etwas Zellsuspension entnommen und in das schon vorgelegte Medium (10ml für 10cm-Schale) in der Zellkulturschale überführt. Nach gründlichem Schwenken wurden die Zellkulturschalen in den Brutschrank gestellt.

Zur Selektion wurde dem Medium, das für die mono- und polyklonalen HCT116/- und DLD1/- DRO1-Zellen verwendet wurde, neben Pen/Strep und FCS noch Hygromycin (50mg/ml; PAA) zugegeben (DLD1-Zellen: 7 µg/ml, HCT116-Zellen: 6µg/ml).

2.2.2 Apoptoseassay

Für die Untersuchung der Apoptosevorgänge in den transfizierten DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1- Zellen, wurden am ersten Tag des Experimentes die Zellen geerntet und mit der gewünschten Dichte ausgesät (8×10^5 Zellen/ 10cm Schale). Am zweiten Tag wurde die Hälfte der Platten mit Doxycyclin stimuliert (1µg/ml, Fluka, Buchs). 24h später wurde dann je eine unstimulierte und eine bereits mit Dox stimulierte Platte mit Protein A (7,5µl/ ml Medium, Biovision, Illmenau) und APO-1-3 (125µl/ml Medium; *Monoclonal antibody to Fas human*, Alexis/ Axxora) stimuliert. Weitere 24h danach wurden die Zellen auf Eis gestellt und zunächst im Floureszenzmikroskop betrachtet. Für die FACS-Messung und SDS-Gelelektrophorese/ Immundetektion wurden sie dann geerntet: Dieser Vorgang wird in 2.3.1 genauer beschrieben.

Das Medium wurde bei den Experimenten zur Apoptose nicht verworfen, sondern die Zellen mit Medium abgekratzt und zentrifugiert, da vor allem die abgestorbenen Zellen ein wichtiger Gegenstand der Untersuchung waren. Ein kleiner Anteil des Zellpellets (ca. 1/8) wurde vor der Lyse entnommen und in 200µl Nicoletti-Puffer (0,1% Na-Citrat, Sigma, St. Louis; 0,1% Triton X-100, LKB-Bromma; 50µg Propidium-Jodid/ml, Sigma, St. Louis) für die FACS-Messung resuspendiert.

2.2.3 Transfektion von Zellen

Für die *Colony Forming Assays* und den Nachweis im Western Blot wurden DLD1- und HCT116-Zellen mit den Konstrukten transfiziert, deren Herstellung unter 2.1 beschrieben wurde.

Am ersten Versuchstag wurden die Zellen von der Zellkulturschale mit Trypsin gelöst, gezählt und zentrifugiert. In Sechs-Loch-Platten wurden je 300.000 Zellen mit 2ml Medium ausgesät. Am Tag zwei wurden die Zellen transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde ein Loch mit pBMN GFP transfiziert, ein Weiteres wurde als Negativkontrolle nicht transfiziert. Für DLD1-Zellen wurde als Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Paisley/UK) verwendet und für HCT116-Zellen Mirus (Trans IT-LT1, Mirusbio, Madison). Zunächst wird das Vorgehen mit Mirus beschrieben:

Für jede zu transfizierende Probe wurden zu 100µl Optimem (GIBCO/Invitrogen, Paisley/UK) 2µl Mirus gegeben und durch Schütteln des Reaktionsgefäßes vermischt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Gemisch zu je 1µg DNA gegeben und ebenfalls durch Wenden des Gefäßes gründlich gemischt. Nun wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und in dieser Zeit das Medium auf den Sechs-Loch-Platten gewechselt (nur noch 1ml Medium/Loch zugegeben). Dann wurde das gesamte Volumen der Proben auf das jeweilige Loch pipettiert, die Platte gut geschwenkt und in den Brutschrank gelegt.

Bei der Transfizierung mit Lipofectamin wurden sofort 50µl Optimem zur DNA gegeben und 50µl Optimem mit 2µl Lipofectamin je Probe vermischt. Die Wartezeiten und der weitere Verlauf waren identisch zur Transfizierung mit Mirus.

Nach mindestens 24-stündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt. Am vierten Tag wurde am Fluoreszenzmikroskop anhand der GFP-Kontrolle überprüft, ob die Transfizierung erfolgreich war. Dann konnten die Zellen entweder für die Immundetektion geerntet (s.2.3.1) oder für *Colony Forming Assays* (s.2.2.4) verwendet werden.

2.2.4 Colony Forming Assay

DLD1- und HCT116-Zellen wurden mit pcDNA3 und den DRO1-Expressionskonstrukten A, B, C, D, E und F, sowie DRO1-Wildtyp transient transfiziert. Die transfizierten Zellen (s.2.2.3) wurden gewaschen, mit Trypsin gelöst und unter dem Mikroskop gezählt. Nach fünfminütiger Zentrifugation wurde das Medium abgesaugt und das Pellet mit frischem Medium gelöst. Für jedes transfizierte Konstrukt wurden drei 10cm-Zellkulturschalen mit 5×10^5 Zellen (HCT116) oder 4×10^5 Zellen (DLD1) ausgesät. Als Kontrolle wurde eine Schale

mit nicht transfizierten HCT116-/ DLD1-Zellen ausgesät. Um zu gewährleisten, dass nur transfizierte Zellen auf den Platten wachsen, wurde G-418 Sulphate (50mg/ml; PAA, Pasching) als Selektionsantibiotikum zugeben. Die erforderliche Konzentration für die jeweilige Zelllinie wurde zuvor ausgetestet, indem nicht transfizierte Zellen unterschiedliche Mengen an G-418 bekamen und beobachtet wurde, bei welcher Konzentration alle Zellen abgestorben waren. HCT116-Zellen benötigten 160µl G-418 (8mg), DLD1-Zellen 150µl G-418 (7,5mg). Auch wurde untersucht, ob ein besseres Ergebnis erzielt werden konnte, wenn die Zellen erst 24h nach Aussaat in Selektion genommen wurden. Dies ergab aber keinen Vorteil gegenüber der sofortigen Zugabe von G-418.

Es erfolgte ca. zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel (mit G-418-Zugabe), solange bis Kolonien auf den Platten zu erkennen waren und zugleich auf der Kontrollplatte alle Zellen gestorben waren. Dann wurde das Medium abgesaugt und alle Zellkulturschalen mit PBS gewaschen. Mit Methylenblau wurden die Zellen für ca. 30 Minuten angefärbt.

Methylenblau:	480 ml	PBS (PAA, Pasching)
	30 ml	25% Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe)
	0,3 g	Methylenblau (Sigma, St. Louis)
	+ Filtrieren	

Tabelle 12

Anschließend wurde mit PBS gewaschen, bis sich keine blaue Farbe mehr löste. Für den letzten Waschschrift wurde destilliertes Wasser verwendet, um die Bildung von Salzrändern zu verhindern. Nachdem die Farbe getrocknet war, wurden die Kolonien fotografiert und anhand der Fotos gezählt

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Zellernte und Lyse

Zunächst mussten die Zellen, die mit der SDS-Gelelektrophorese genauer untersucht werden sollten, geerntet werden. Dazu wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und einmal mit PBS gewaschen; dem PBS wurde zuvor ein Protease-Inhibitor (Complete Mini, Roche, Basel) zugegeben. Im nächsten Schritt wurde 1ml (bei 10cm Schale) PBS auf die Platten gegeben (0,5ml PBS bei 6cm Platten oder kleiner) und die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Da in den Experimenten Vorgänge an der Zellmembran untersucht werden sollten, wurde zum Ablösen der Zellen nicht das proteolytische Enzym Trypsin verwendet, sondern der Zellschaber (100). Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt und eine Minute bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1x Reporter-Lysepuffer (Promega, Madison) lysiert, wobei die Menge – abhängig von der Pelletgröße – zwischen 25 und 80 µl betrug. Anschließend wurde das Lysat für 15 Minuten auf Eis gestellt. Um die restliche DNA zu zerstören, wurde dann 1µl Benzonase-Nuclease (25U/µl, Novagen/Merck, Darmstadt) zugegeben und die Proben wurden noch zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Zustand konnten die Lysate entweder bei –40°C aufbewahrt oder direkt für die Gelelektrophorese verwendet werden.

2.3.2 Bestimmen der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode, die auf der Bindung von *Coomassie brilliant blue* an die Proteine und der daraus folgenden Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbe beruht (101).

Zu Beginn wurde eine Standardkurve erstellt: Es wurden für die Doppelbestimmung jeweils zwei Eppendorf-Gefäße mit 0,5µl, 1µl, 2µl, 4µl und 8µl BSA (1mg/ml, *Bovine Serum Albumin*, Sigma, St. Louis gelöst in TBST, s.2.3.5) befüllt. Ein weiteres Gefäß blieb ohne BSA-Zugabe als Leerwert für den Nullabgleich. Nach kurzem Mischen wurden für jede zu analysierende Probe 0,5µl des Zelllysates in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Das Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay®, Hercules) wurde mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5 verdünnt und je 1ml in die Reaktionsgefäße gegeben. Am Photometer wurden die Proben nach kurzem Schütteln in die Küvetten umgefüllt und ihre Absorption bei 595nm gemessen. Anschließend wurden die Werte in eine Excel-Tabelle eingetragen und mittels Standardabweichung die einzusetzende Proteinmenge berechnet.

2.3.3 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte mit dem Mini-Protean-II-System von BioRad.

2.3.3.1 Vorbereiten der Proben

Dem Zelllysate wurden 30 µg entnommen und mit Wasser auf die Hälfte des Zielvolumens aufgefüllt (für 15er Kämme insgesamt 20 µl, für 10er Kämme insgesamt 30 µl). 450 µl Lämmli-Puffer (125 mM Tris, Roth, Karlsruhe, pH= 6.8; 4% SDS; Bromphenolblau 129H3462, Sigma, St. Louis) wurden mit 50 µl DTT (Sigma, St. Louis) vermischt, damit wurden die Proben dann dem Endvolumen angepasst. Für jedes Gel wurden 5 µl Proteinmarker (Precision Plus Protein Standards All Blue®, BioRad, Hercules) eingesetzt. Die Proben wurden 5 Minuten lang bei 95°C im Heizblock gekocht, um die Proteine vollständig aufzulösen, mögliche Proteasen zu inaktivieren und Tertiärstrukturen zu unterbinden (101) und danach kurz zentrifugiert.

2.3.3.2 Acrylamid-Gele

Zunächst wurde ein 10%iges Trenngel gegossen, zwischen die Glasplatten eingefüllt und bis zur vollständigen Polymerisation mit etwas 0,1%iger SDS-Lösung überschichtet.

Trenngel 10%	4,0 ml	H ₂ O
	2,5 ml	1,5M Tris (pH 8,8)
	3,3 ml	30% Acrylamide/Bis Solution (BioRad, Hercules)
	0,1 ml	10% SDS
	0,1 ml	10% Ammonium-Persulfat (Sigma, St. Louis)
	0,004 ml	TEMED (BioRad, Hercules)
	10 ml (für 2 Gele)	

Tabelle 13

Nach ca. 30 Minuten konnte das 5%ige Sammelgel gegossen werden. Dieses wurde nach Abkippen der SDS-Lösung über das Trenngel pipettiert und ein Kamm eingesetzt (1,0mm Dicke).

Sammelgel 5%	3,4 ml	H ₂ O
	0,63 ml	1,5M Tris (pH 6,8)

	0,83 ml	30% Acrylamide/Bis Solution
	0,05 ml	10% SDS
	0,05 ml	10% Ammonium-Persulfat
	0,005 ml	TEMED
	5 ml (für 2 Gele)	

Tabelle 14

2.3.3.3 Laufpuffer

Der 10x Laufpuffer enthielt folgende Komponenten:

SDS-Laufpuffer (10x):	30,3 g	0,25M Tris Base (Roth, Karlsruhe)
	144,0 g	1,92M Glycine (Roth, Karlsruhe)
	10,0 g	1% SDS (Fluka, Buchs)
	Auf 1000ml auffüllen	H ₂ O

Tabelle 15

Für jede Gelelektrophorese wurden 1000ml 1x Laufpuffer benötigt.

2.3.3.4 Gelelektrophorese

Die Gelkammer wurde nun zusammgebaut, der Kamm vorsichtig entfernt und etwas Laufpuffer vorgelegt. Die aufgekochten Proben und der Marker wurden mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen gefüllt und der restliche Laufpuffer in die Kammer gegossen. Es wurden zuerst für 15 Minuten 100V Spannung angelegt und anschließend für ca. 45 Minuten 200V.

2.3.4 Western Blot

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Proteine mittels Western Blot (Mini-Protean-II, BioRad, Hercules) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Billerica) übertragen. Dazu wurden in eine Kassette nacheinander ein Schwamm, Filterpapier (Whatman/ GE Healthcare, Chalfont), die PVDF-Membran, das Acrylamidgel, wieder Filterpapier und ein Schwamm gelegt und luftdicht verschlossen. Die Membran wurde zuvor für eine Minute zum Quellen in Methanol (Merck, Darmstadt) gelegt, da wässrige Lösungen die trockene PVDF-Membran nicht benetzen (101) und anschließend in Transferpuffer wieder äquilibriert. Die Kassette wurde zusammen mit einem Eisblock und einem Rührfisch in die Kammer gegeben und diese mit Transferpuffer aufgefüllt.

Folgender Transferpuffer wurde verwendet:

Transferpuffer (10x):	80,0 ml	1 M Tris Base
	13,3 ml	3 M NaOAc (Roth, Karlsruhe)
	8,0 ml	0,5 M EDTA (Sigma, St. Louis)
	10,0 ml	10% SDS
	400,0 ml	MeOH (Merck, Darmstadt)
	Auf 2000 ml auffüllen	H ₂ O

Tabelle 16

Um die Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran zu aktivieren, wurde dem Transferpuffer das Methanol zugegeben (10l). Der Puffer wurde mehrfach wiederverwendet und im Kühlraum gelagert.

Der Transfer erfolgte auf einem Magnetrührer bei 400mA für ca. eine Stunde (abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine).

2.3.5 Immundetektion

Anschließend wurde die Membran der Kassette entnommen und in Blocking-Lösung entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° (eingeschweißt) geschwenkt, um die restlichen Proteinbindungsstellen zu sättigen. Als Lösungen kamen – abhängig vom gewünschten Antikörper – 5%ige Milch (*Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk*, BioRad, Hercules; gelöst in TBST) oder BSA (Sigma, St. Louis; gelöst in TBST) zum Einsatz. Um TBST zu erhalten, wurde 25x TBS (s.u.) zu 1x TBS mit Aqua dest. verdünnt, 0,2% Tween®20 (Roth, Karlsruhe) zugegeben und gut verrührt.

TBS 25x:	60 g	Tris Base
	200 g	NaCl
	7,9 ml	12 N HCl
	Auf 1000ml auffüllen und pH 7,6 einstellen	H ₂ O

Tabelle 17

Nach dem Blocken wurde die Lösung vorsichtig abgekippt und die Membran zweimal kurz mit TBST gewaschen. Danach wurde die PVDF-Membran mit der primären Antikörper-Lösung auf dem Schüttler inkubiert:

Primärantikörper	Hersteller	Gelöst in	Verdünnung	Inkubation
HA (Rat-AK, Clon 3F10)	Roche (Basel)	1% Milch-Lsg.	1:2000	1 h RT
Caspase 8	Cell Signaling (Danvers)		1:1000	4°C üN
FADD (S-18) (sc6035)	Santa Cruz (Santa Cruz)		1:1000	4°C üN
pFADD (ser194)	Cell Signaling		1:1000	4°C üN
FLIP _{S/L} (G-11) (sc5276)	Santa Cruz	BSA-Lsg.	1:200	4°C üN
Actin Immuno	MP Bio (Irvine)	1% Milch-Lsg.	1:2000	1 h RT

Tabelle 18

Nach Abkippen der Primärantikörperlösung wurde die Membran bei Raumtemperatur zweimal kurz und danach zweimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Dann wurde die Sekundärantikörperlösung zugegeben und die Membran wieder auf den Schüttler gelegt.

Sekundärantikörper	Hersteller	Gelöst in	Verdünnung	Inkubation
Anti-mouse	GE-Healthcare (Chalfont)	1% Milch-Lsg.	1:10.000	1 h RT
Goat-Anti-rat (IgG-HRP)	Santa Cruz	1% Milch-Lsg.	1:10.000	1 h RT
Donkey-Anti-goat (IgG-HRP)	Santa Cruz			
Anti-rabbit	GE-Healthcare	1% Milch-Lsg.		

Tabelle 19

Es folgten – nach Abschütten der Sekundärantikörperlösung – weitere Waschschrte mit TBST: zweimal wenige Sekunden und anschließend zweimal 20 Minuten.

Zur Detektion wurde die Membran 10-15 Minuten lang mit je 800µl der ECL-Reagenzien (Super Signal West Pico, Pierce, Rockford) eingeschweißt und dann in eine Filmkassette zwischen zwei Folien gelegt. Der Film (Thermo CL-X Posure, Thermo, Waltham) wurde unterschiedlich lange belichtet (abhängig von Signalstärke; meist ½, 1, 5, 15, 30 und 60 Minuten) und im Gerät Curix 60 (Agfa, Morsel) entwickelt.

Die Membran wurde anschließend mit TBST abgespült, getrocknet und – in Folie eingeschlagen – für mögliche weitere Proteindetektionen aufbewahrt. Hatten die neu zu detektierenden Proteine fast die gleiche Größe wie bei der vorangegangenen Detektion oder forderte der Primärantikörper den gleichen Sekundärantikörper wie zuvor, wurde die Membran vor Wiederverwendung fünf Minuten gestrippt (Stripping-Puffer: 10% Essigsäure, 10% Methanol: Merck, Darmstadt), um den Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen und anschließend gründlich in TBST gewaschen.

3. Ergebnisse

3.1 Generieren von DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1- Zellen

Die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien DLD1 und HCT116 wurden mit dem induzierbaren Expressionsvektor pRTS-1, der die kodierende Sequenz für DRO1 enthält, stabil transfiziert (84) (102). Dabei wurde in einem – dieser Promotionsarbeit vorausgehenden – Projekt eine polyklonale Zelllinie und aus dieser mehrere monoklonale Zelllinien generiert. Zur Expression von DRO1 wurden die monoklonalen DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1-Zellen mit Doxyzyklin stimuliert und die Expression von DRO1 mittels Immunodetektion untersucht (Abb.6).

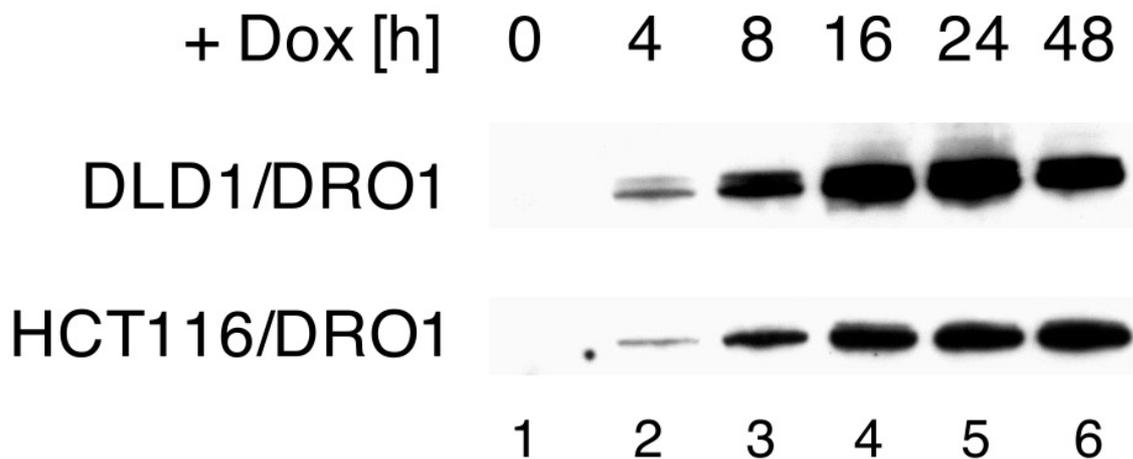


Abb. 6 Expressionsnachweis von DRO1 in stabil transfizierten DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1- Zellen
Die Kolonkarzinomzelllinien DLD1 und HCT116 wurden stabil mit einem Doxyzyklin-induzierbaren DRO1-Expressionskonstrukt transfiziert. Mit einem gegen das Epitop-Tag Hemagglutinin (HA) gerichteten Antikörper wurde die Expression von DRO1 in diesen Zellen mittels Immunoblot nachgewiesen.

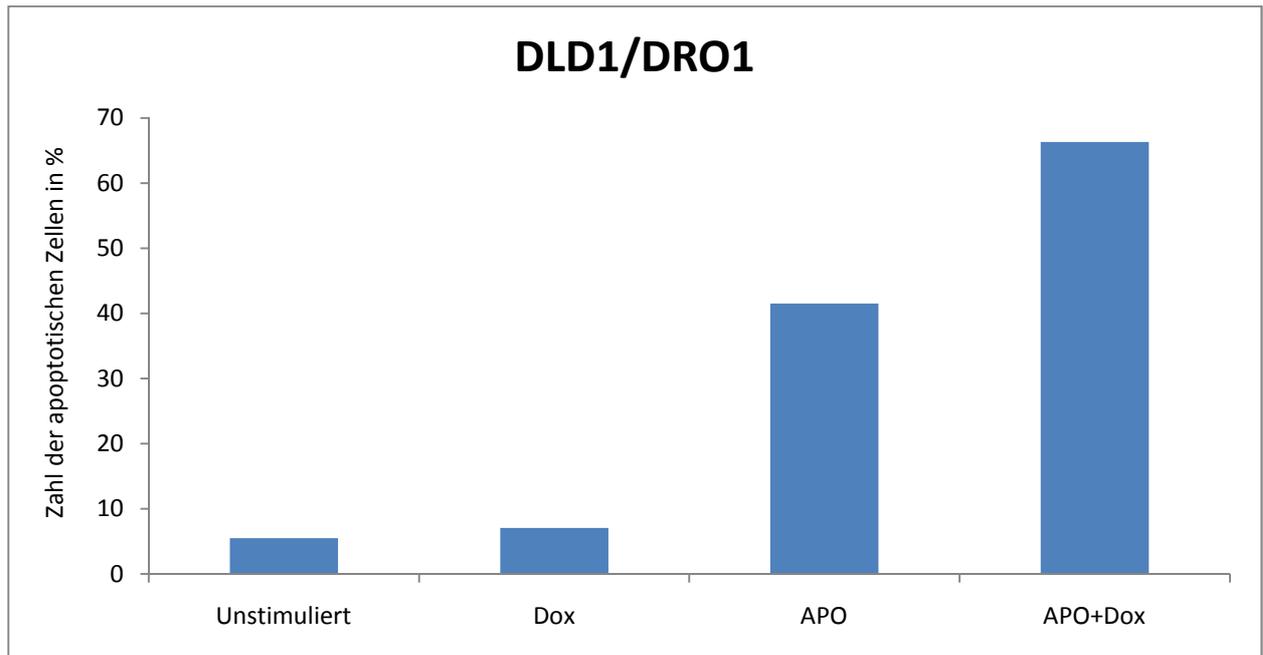
3.2 Expression von DRO1 sensitiviert Zellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose

Es wurde untersucht, ob DRO1 eine Steigerung der Apoptoserate bei Kolonkarzinomzellen bewirken kann (84). Nach Expression von DRO1 durch Doxyzyklin wurden die

DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1-Zellen mit dem aktivierenden CD95-Antikörper APO inkubiert, um die Zellen apoptotisch werden zu lassen.

Im Durchflusszytometer wurde geprüft, ob die Expression von DRO1 in den Zellen zu einer Steigerung der Rezeptor-vermittelten Apoptose führt. Zu diesem Zweck wurde die Zahl der apoptotischen Zellen in Gegenwart von APO und Doxyzyklin gemessen und mit der Zahl der apoptotischen Zellen nach Behandlung allein mit APO verglichen.

A



B

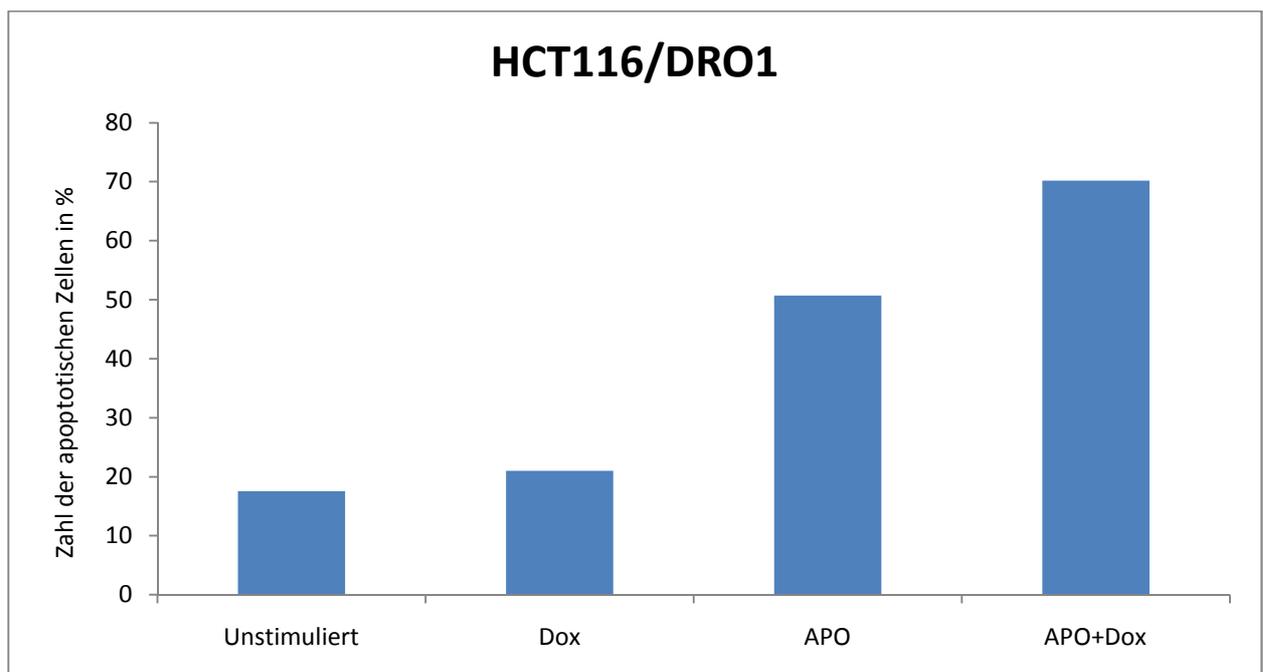


Abb. 7 DRO1 sensitiviert Zellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose

DLD1/DRO1- (A) und HCT116/DRO1- (B) Zellen wurden mit Doxyzyklin und mit APO behandelt, nur mit APO, nur mit Dox oder gar nicht stimuliert. Für die so behandelten Zellen wurde im Durchflusszytometer nach Nicoletti-Färbung die Apoptoserate bestimmt.

Dabei zeigten Zellen, die mit Dox und APO stimuliert worden sind, eine Zunahme der Apoptoserate um 20 bis 25% im Vergleich zu nur mit APO-behandelten Zellen (Abb. 7).

Das Ergebnis dieser Messungen deutet daraufhin, dass die Expression von DRO1 Kolonkarzinomzellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose sensitiviert und bestätigt somit bereits erfolgte Messungen mit konstitutiv DRO1 exprimierenden Zellen.

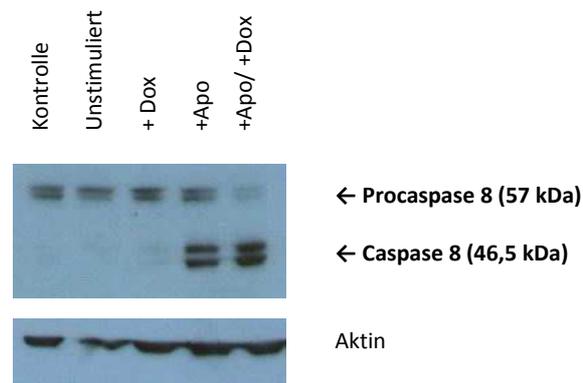
3.3 DRO1 verändert die Expressionsmenge einiger Apoptosemoleküle

An der Rezeptor-vermittelten Apoptose sind unter anderem die Moleküle Caspase-8, FADD und FLIP beteiligt. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung des Multiproteinkomplexes DISC (*death-inducing signaling complex*), der mit Hilfe von *Death Domains* und *Death Effector Domains* für die Aktivierung weiterer Moleküle sorgt und somit für den Ablauf der Apoptose entscheidend ist. Um festzustellen, wie DRO1 die Zellen für Apoptose sensitiviert, wurde die Expression dieser Apoptosemoleküle auf Proteinebene untersucht.

3.3.1 Expression von DRO1 verstärkt die Umwandlung von Caspase 8 in seine aktive Form

Das Caspase-8-Molekül hat eine zentrale Stellung während der Rezeptor-vermittelten Apoptose. Deshalb wurde in Immunoblots mit einem Caspase-8-Antikörper untersucht, ob in DRO1-exprimierenden Zellen Caspase-8 vermehrt in die aktive Form überführt wird. Für die inaktive Form von Caspase-8 wurde ein Signal bei einem Molekulargewicht von 57 kDa erwartet, die biologisch aktiven Spaltprodukte sind 46,5 kDa und 17/18 kDa groß (103).

A DLD1/DRO1



B HCT116/DRO1

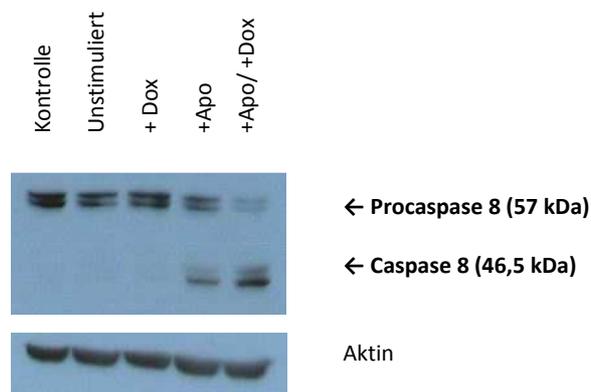


Abb. 8 DRO1 verstärkt die Umwandlung von Caspase-8 in seine aktive Form in DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1-Zellen.

(A) DLD1/DRO1-Zellen und (B) HCT116/DRO1-Zellen wurden 48h mit Dox und anschließend mit dem CD95-Antikörper APO stimuliert, um Apoptose zu induzieren. Totale Zelllysate wurden erstellt und die Expression von Caspase-8 mit einem Caspase-8-Antikörper durch Immunodetektion analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

In den Lysaten der unstimulierten Zellen konnte das inaktive Procaspase-8-Molekül nachgewiesen werden. Sowohl bei DLD1/DRO1- als auch bei HCT116/DRO1-Zellen ist zu erkennen, dass die Stimulation mit APO zu einer Spaltung und somit Aktivierung von Caspase-8 führte. Im Vergleich dazu zeigte sich, dass die Behandlung der Zellen mit Dox und

APO eine fast vollständige Umwandlung des Procaspase-Moleküls und dadurch eine stärkere Aktivierung von Caspase-8 bewirkte.

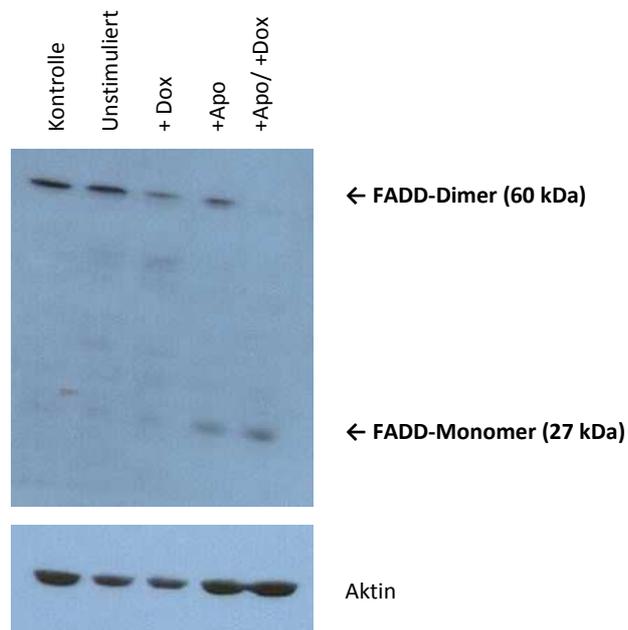
Somit konnte in diesem Experiment nachgewiesen werden, dass die Expression von DRO1 in Zellen die Caspase-8-Spaltung steigert und Caspase-8 vermehrt in die aktive Form überführt wird.

3.3.2 Expression von DRO1 verstärkt die Bildung der aktiven Form von FADD

Das Protein FADD ist ein wichtiger Bestandteil des DISC-Komplexes und entscheidend für die Caspase-8-Aktivierung. Da gezeigt werden konnte, dass die Spaltung von Caspase-8 in Gegenwart von DRO1 vermehrt wird, wurde im nächsten Schritt geprüft, ob DRO1 das Adaptermolekül FADD verstärkt für den extrinsischen Apoptosesignalweg rekrutieren kann.

Das Apoptosemolekül FADD liegt im inaktiven Zustand als 60 kDa-großes Homodimer in Zellen vor, das aktive FADD-Molekül ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von 27 kDa (46) (104).

A DLD1/DRO1



B HCT116/DRO1

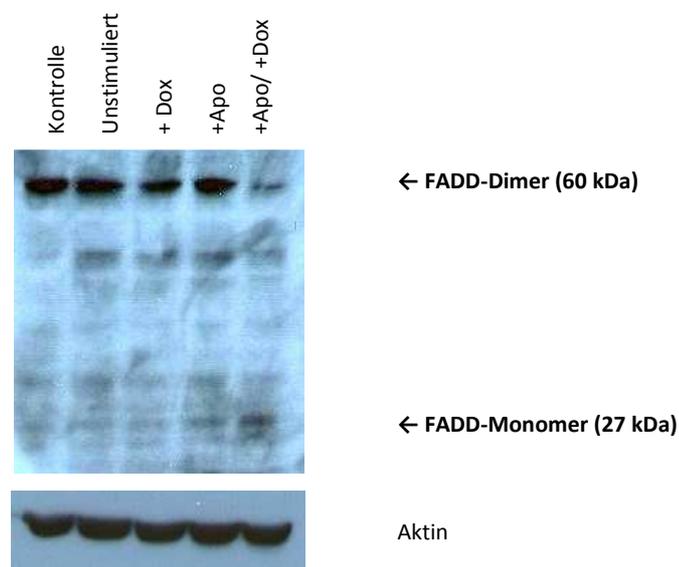


Abb. 9 Expression von DRO1 verstärkt die Bildung der aktiven Form von FADD

Stabil mit DRO1 transfizierte DLD1/DRO1- (A) und HCT116/DRO1- Zellen (B) wurden 48h mit Doxyzyklin (Dox) und anschließend mit dem CD95-Antikörper APO stimuliert, um Apoptose zu induzieren. Totale Zelllysate wurden erstellt und die Expression von FADD mittels Immunodetektion analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

Bei der Immunodetektion konnte das aktivierte FADD-Molekül nur in Zelllysaten nachgewiesen werden, die mit APO stimuliert wurden. Dabei zeigten Zellen, bei denen zusätzlich die Expression von DRO1 induziert wurde, die größte Menge an FADD-Monomer. Es konnte dadurch sowohl in DLD1- als auch in HCT116-Zellen bestätigt werden, dass unter Einfluss von DRO1 das inaktive FADD-Dimer verstärkt in seine aktive Form überführt wird.

3.3.3 Expression von DRO1 bewirkt keine Zunahme der Menge an phosphoryliertem FADD

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass DRO1 zu einer Erhöhung der Menge des aktiven FADD-Monomers führt. Die Phosphorylierung von FADD spielt eine wichtige Rolle für die Regulierung vieler zellphysiologischer Vorgänge, wie z.B. Kontrolle des Zellzyklus und Modulation des NF- κ B-Signalweges (22). Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, ob in Gegenwart von DRO1 eine verstärkte Phosphorylierung des monomeren FADD-Moleküls auftritt.

DLD1/DRO1

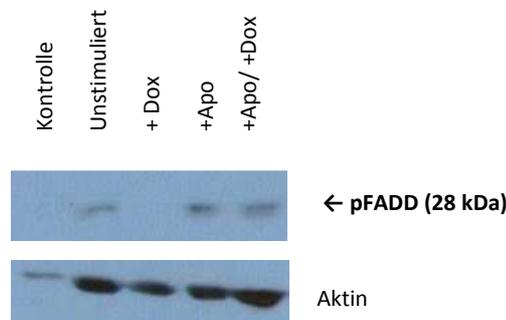


Abb. 10 Expression von DRO1 bewirkt keine Expressionssteigerung von phosphoryliertem FADD

Stabil mit DRO1 transfizierte DLD1/DRO1-Zellen wurden 48h mit Dox und anschließend mit dem CD95-Antikörper APO stimuliert, um Apoptose zu induzieren. Totale Zelllysate wurden erstellt und die Expression von Phospho-FADD mittels Immunodetektion analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

Der im Immunoblot verwendete Antikörper detektiert Phospho-FADD mit einem Molekulargewicht von 28 kDa (105).

Das erhaltene Signal war bei Zellen, die DRO1 exprimierten, genauso stark abgebildet, wie bei Zellen, die nur mit APO stimuliert wurden. Außerdem wiesen sogar die unstimulierten Zellen das 28 kDa-Fragment auf. Das Experiment wurde auch mit HCT116/DRO1-Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt), dabei waren jedoch auch keine Unterschiede in der Expression von Phospho-FADD erkennbar.

Die Menge an phosphoryliertem FADD kann durch eine DRO1-Expression folglich nicht erhöht werden.

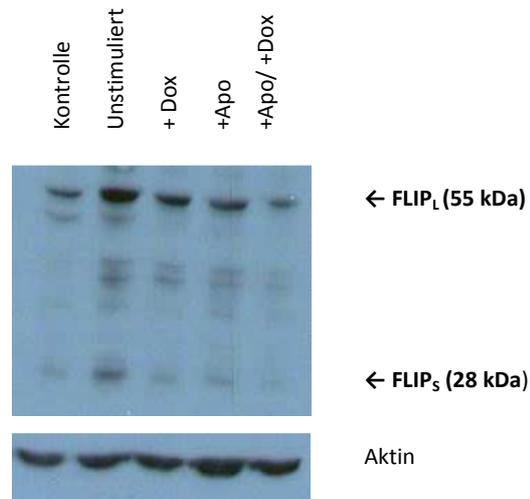
3.3.4 Expression von DRO1 hat einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von FLIP

FLIP kann während der Apoptose als Bestandteil des DISC-Komplexes sowohl als Apoptoseinhibitor, als auch als Aktivator agieren. Das kurze FLIP_S-Protein inhibiert den Ablauf der Apoptose, indem es eine für die Procaspase-8 wichtige Domäne blockiert. Hingegen kann das lange FLIP_L-Molekül abhängig von seinem Expressionslevel die Apoptose bremsen oder auch beschleunigen.

Da alle FLIP-Unterformen bei ihrer Aktivierung stark von Caspase-8 und FADD abhängig sind, wurde als Nächstes untersucht, ob es auch einen Zusammenhang zwischen der FLIP- und der DRO1-Expression gibt.

FLIP_S hat ein Molekulargewicht von 28 kDa, FLIP_L von 55 kDa (106). Beide Spleißvarianten von FLIP wurden durch den Antikörper erkannt.

A DLD1/DRO1



B HCT116/DRO1

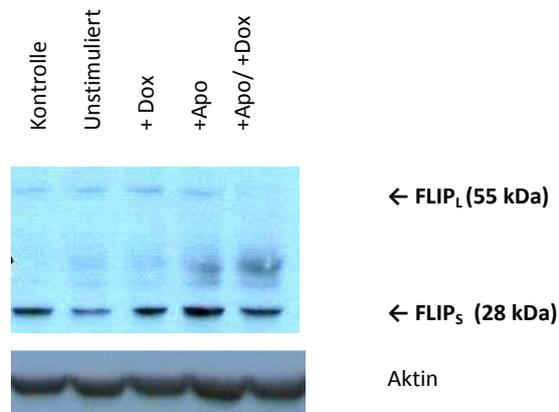


Abb. 11 Expression von DRO1 hat einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von FLIP

Stabil mit DRO1 transfizierte DLD1- (A) und HCT116-Zellen (B) wurden 48h mit Dox und anschließend mit dem CD95-Antikörper APO stimuliert, um Apoptose zu induzieren. Totale Zelllysate wurden erstellt und die Expression von FLIP mit Hilfe der Immunodetektion analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

Das Apoptose-hemmende FLIP_S-Molekül zeigte bei den DLD1-Zellen das stärkste Signal bei den unstimulierten Zellen. Die apoptotischen DRO1-Zellen hatten nur eine schwache FLIP_S-

Bande. In HCT116-Zellen waren die Intensitäten der Banden für FLIP_S in allen fünf Proben vergleichbar.

FLIP_L zeigte sowohl bei den HCT116-Zellen als auch bei den DLD1-Zellen in den Lysaten der APO- und Dox-stimulierten Zellen das schwächste Signal.

Somit führt die Expression von DRO1 in DLD1-Zellen zu einer verringerten Expression des Apoptose-hemmenden FLIP_S- und des meist proapoptotischen FLIP_L-Moleküls. In HCT116-Zellen scheint DRO1 nur die Expression von FLIP_L zu reduzieren.

3.4 DRO1-Konstrukte mit zwei *Internal Repeats* können ebenso wie DRO1-Wildtyp Koloniewachstum hemmen

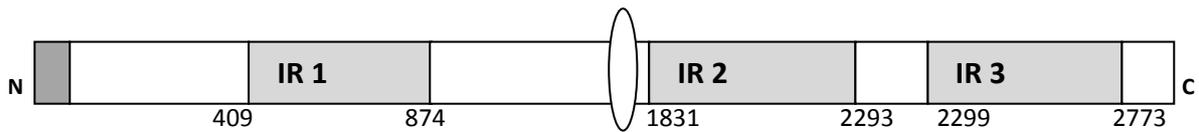
Nachdem im ersten Teil der Doktorarbeit der Einfluss von DRO1 auf die Expression von Komponenten des DISC-Komplexes untersucht wurde, wurden im zweiten Abschnitt die Struktur des DRO1-Proteins und deren Funktion genauer analysiert. Um beurteilen zu können, welche Bereiche von DRO1 für die tumorsupprimierenden Eigenschaften entscheidend sind, wurden sechs Deletionskonstrukte erstellt (Abb.12). Diese wurden in einen Expressionsvektor ligiert, in Kolonkarzinomzelllinien transfiziert, selektiert, die Expression mit Hilfe der Immunodetektion analysiert und anschließend im *Colony Forming Assay* die Wirkung der Mutanten anhand der Koloniebildung beurteilt.

3.4.1 Erstellen der DRO1-Konstrukte

Das DRO1-Protein besteht aus 951 Aminosäuren. Durch Sequenzvergleiche von DRO1-Proteinen aus verschiedenen Spezies konnten drei hochkonservierte Bereiche – die sogenannten *Internal Repeats 1, 2 und 3* – identifiziert werden (84). Diese scheinen für die Funktion von DRO1 am bedeutendsten zu sein. Deshalb wurden in den Konstrukten die *Internal Repeats* einzeln oder paarweise deletiert, oder auch vollständig entfernt.

Die Mutanten A, B, und C setzten sich aus verschiedenen langen aminoterminalen Abschnitten zusammen; bei den anderen drei Deletionskonstrukten D, E und F handelte es sich um unterschiedlich große carboxyterminale Fragmente (s.Abb.12).

DRO1-Wildtyp:



Konstrukte:

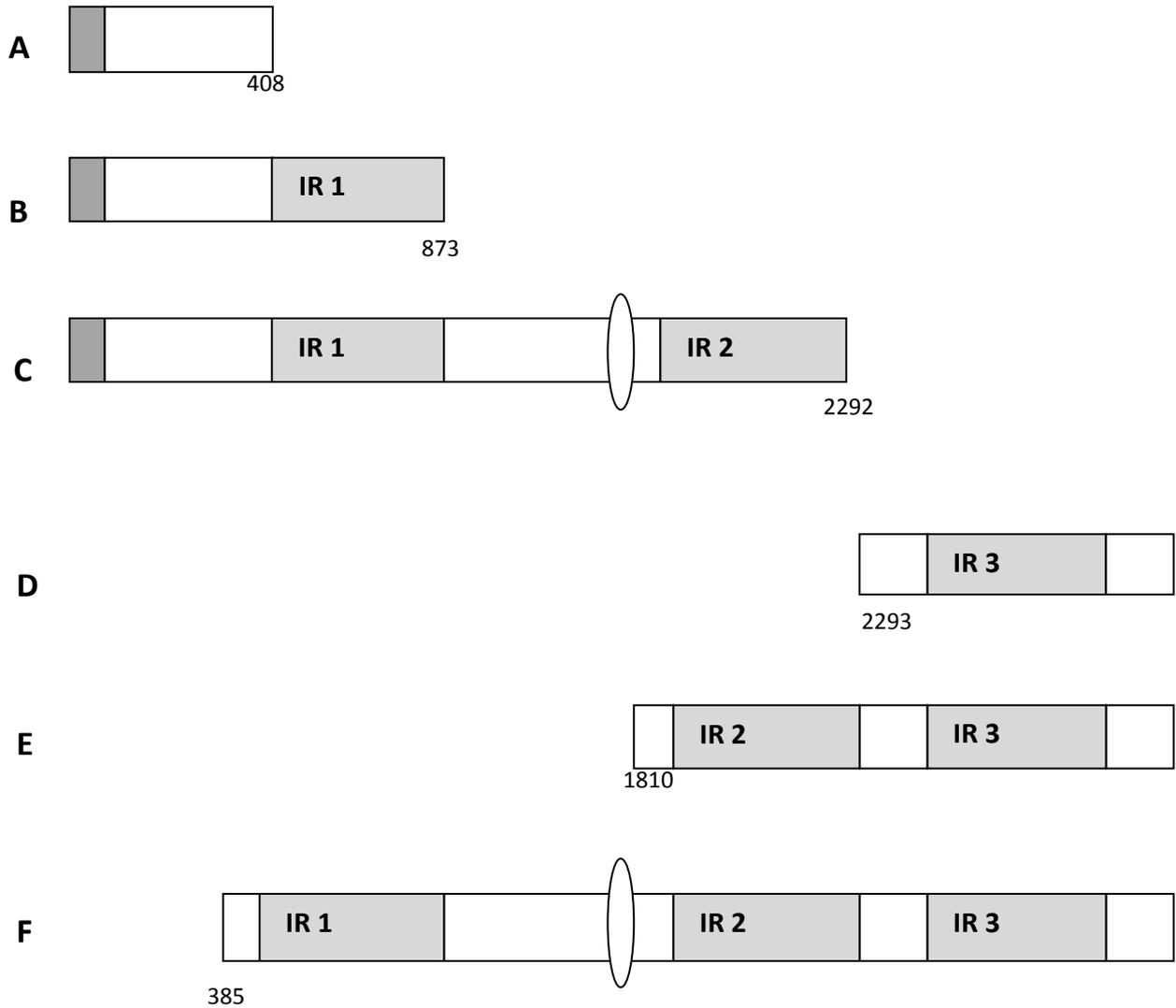
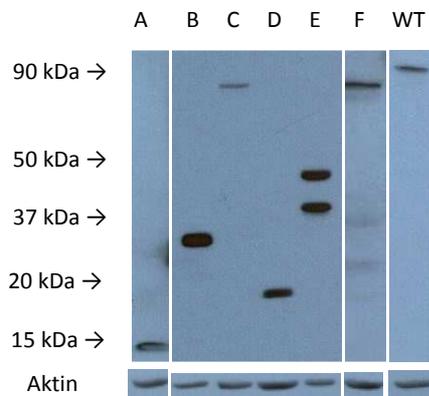


Abb. 12 Aufbau von DRO1-Wildtyp-Protein und sechs DRO1-Mutanten

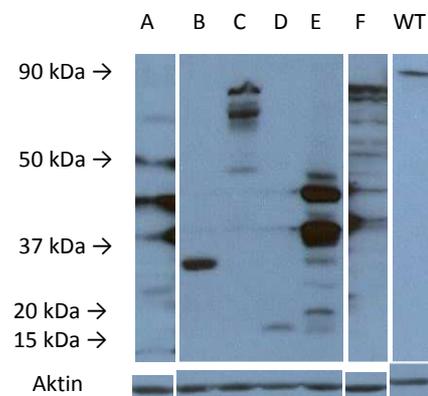
Schematische Darstellung des DRO1-Wildtyp-Proteins und den daraus konstruierten DRO1-Mutanten. Es wurden sechs Deletionskonstrukte erstellt, die durch amino- bzw. carboxyterminale Verkürzung aus dem DRO1-Wildtyp-Protein hervorgegangen sind. Die Konstrukte enthalten jeweils verschiedene Kombinationen der *Internal Repeats* (IR) 1-3, die hochkonservierte Regionen des Proteins darstellen.

■ Signalpeptid ○ Coiled-coil Region

A DLD1



B HCT116



C Molekulargewicht der Primärsequenzen der einzelnen Konstrukte

A: 15kDa	D: 20kDa
B: 32kDa	E: 38kDa
C: 84kDa	F: 90kDa

Abb. 13 Expression von DRO1-Wildtyp-Protein und der sechs DRO1-Mutanten

A, B: DLD1-(A) und HCT116-(B) Zellen wurden transient mit Wildtyp-DRO1 (WT) und den verschiedenen Deletionskonstrukten A-F transfiziert, totale Zelllysate erstellt und die Expression mit einem HA-Antikörper analysiert. Für die Konstrukte B,C,D,E und DRO1-WT(HCT116-Zellen) war eine Belichtungszeit von 30 Sekunden ausreichend. Bei der Darstellung der Mutanten A und F und DRO1-WT(DLD1-Zellen) war eine deutlich längere Expositionszeit von 60 Minuten notwendig. Aktin diente als Ladekontrolle.

C: Das zu erwartende Molekulargewicht der Konstrukte wurde anhand der enthaltenen Basenpaare berechnet. Die Banden im Immunoblot wurden mit den Berechnungen verglichen.

Um die Expression der DRO1-Mutanten in den Kolonkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden DLD1- und HCT116- Zellen transient transfiziert, Zelllysate erstellt und die Proteine im Immunoblot mit einem HA-Antikörper inkubiert. Die Konstrukte B, C, D und E wiesen bereits nach kurzer Belichtungszeit (30 Sekunden) größtenteils kräftige Banden auf. Dagegen zeigte sich in beiden Zelllinien nur eine schwache Expression der Konstrukte A und F, bei den DLD1-Zellen war auch DRO1-Wildtyp nur schwach exprimiert und es mussten somit längere Belichtungszeiten (60 Minuten) gewählt werden. Auch durch Zugabe von Proteaseinhibitoren konnte das Ergebnis nicht verbessert werden (Daten nicht gezeigt). Die Aktin-Kontrolle bewies jedoch eine gleichmäßige Beladung des Gels.

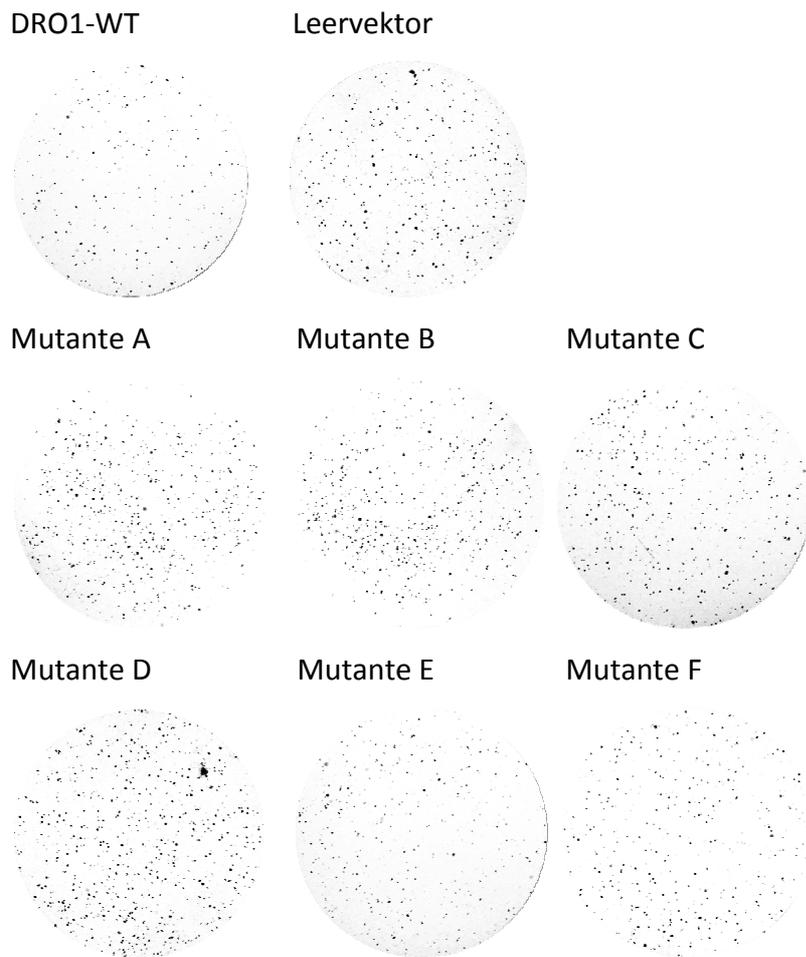
Für die Mutante E konnten sowohl in DLD1-Zellen, als auch in HCT116-Zellen zwei Banden nachgewiesen werden. Die untere Bande entsprach mit 38 kDa der erwarteten Größe. Bei

allen anderen Konstrukten stimmten die Banden mit den erwarteten Größen überein.

3.4.2 *Colony Forming Assays*

Um zu überprüfen, welche Abschnitte des DRO1-Proteins entscheidend für seine Funktion als Tumorsuppressor sind, wurden die DRO1-Mutanten A bis F transient in DLD1- und HCT116-Zellen transfiziert und die Zellen anschließend mit G418 selektiert. Anhand eines *Colony Forming Assay* wurde der Einfluss der DRO1-Mutanten auf die Fähigkeit der Zellen, Kolonien zu bilden, untersucht. Die entstandenen Kolonien wurden fotografiert und gezählt.

A



B

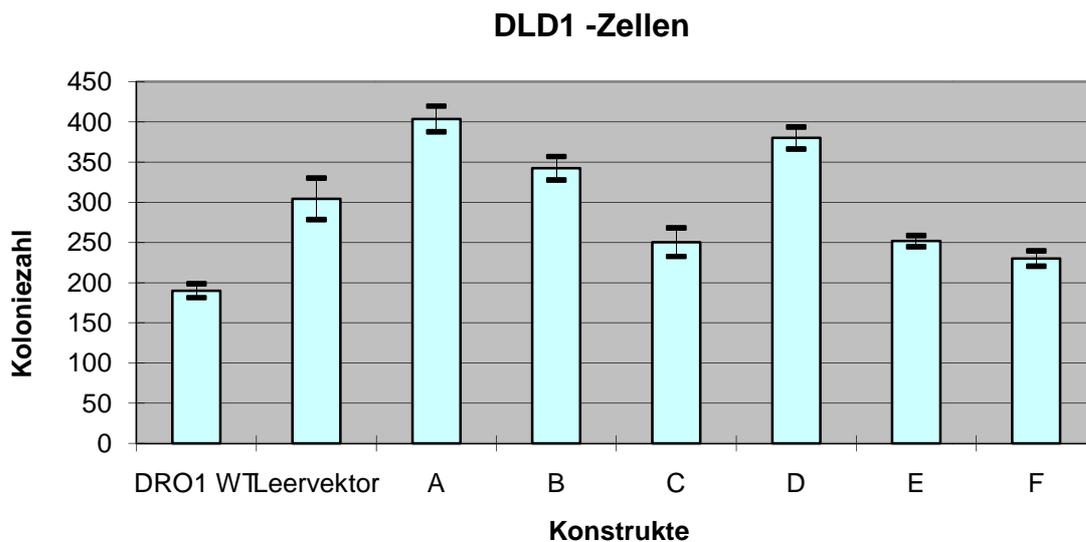
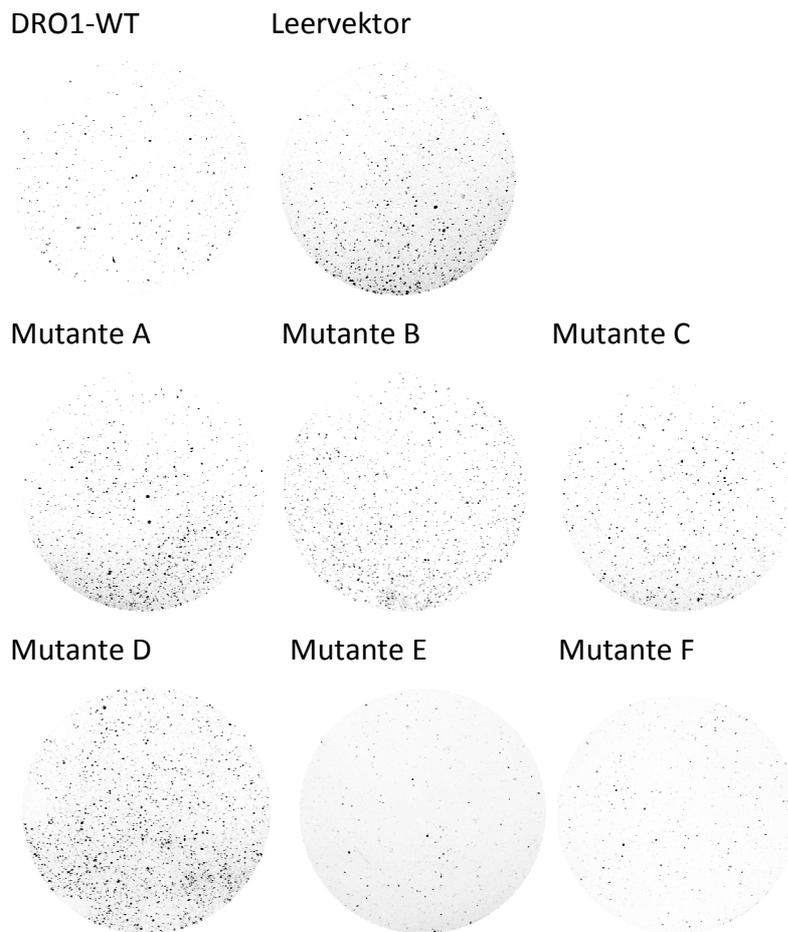


Abb. 14 Colony Forming Assay mit DRO1-WT und DRO1-Mutanten in DLD1-Zellen

A: DLD1-Zellen wurden mit mutierten DRO1-Konstrukten transfiziert und nach Koloniebildung gefärbt, fotografiert und gezählt. DRO1-WT und der Kontrollvektor pcDNA3 wurden als Kontrollen und Bezugspunkte verwendet. **B:** Die Kolonien wurden für die unter (A) dargestellten DRO1-Konstrukte gezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für jeweils drei Replikate.

A



B

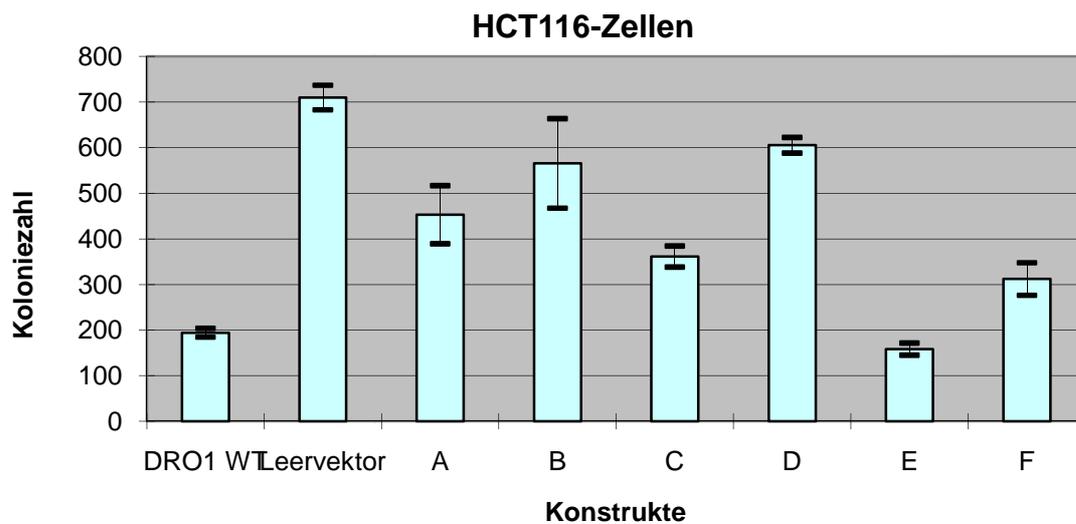


Abb. 15 Colony Forming Assay mit DRO1-WT und Konstrukten in HCT116-Zellen

A: HCT116-Zellen wurden mit mutierten DRO1-Konstrukten transfiziert und nach Koloniebildung gefärbt, fotografiert und gezählt. DRO1-WT und der Kontrollvektor pcDNA3 wurden als Kontrollen und Bezugspunkte verwendet. **B:** Die Kolonien wurden für die unter (A) dargestellten DRO1-Konstrukte gezählt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für jeweils drei Replikate.

Die Abbildungen 14 und 15 lassen erkennen, dass sowohl bei den DLD1- als auch bei den HCT116-Zellen DRO1-Wildtyp die Koloniebildung im Vergleich zum Leervektor pcDNA3 deutlich unterdrücken konnte.

Die Konstrukte C, E und F können wie DRO1-Wildtyp die Zahl der gebildeten Kolonien in beiden Zelllinien verringern (s. Abb. 14 und 15). Vor allem in den HCT116-Zellen waren nach Färbung deutlich weniger Kolonien für diese Konstrukte als für den Leervektor zu erkennen (s. Abb. 15).

Die Mutante C, die IR1 und IR2 enthält, konnte in beiden Zellreihen das Koloniewachstum erkennbar reduzieren, eine bessere Wirkung zeigten aber die Konstrukte E und F: beide erreichten näherungsweise den Effekt von DRO1-Wildtyp (s. Abb. 14 und 15). Mutante E hatte in den HCT116-Zellen sogar noch eine bessere Wirkung auf die Unterdrückung der Koloniebildung als Mutante F, obwohl F alle drei *Internal Repeats* besaß, E dagegen nur IR2 und IR3. In DLD1-Zellen waren die Konstrukte C, E und F in ihrer Wirksamkeit miteinander vergleichbar.

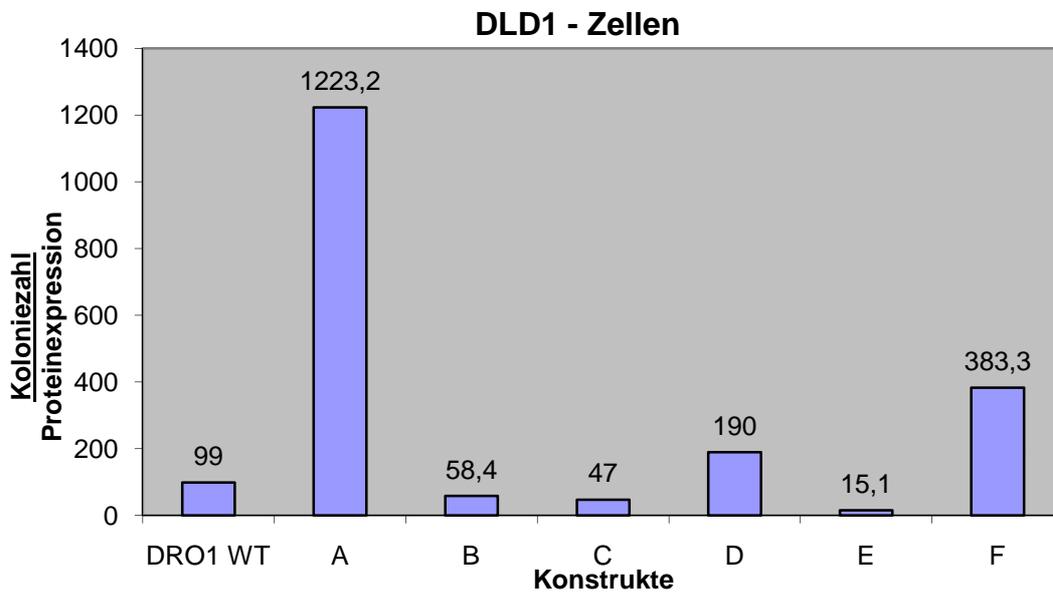
In beiden Zelllinien konnten die Konstrukte A, B, und D die Koloniebildung nicht wesentlich unterdrücken. Bei den DLD1-Zellen überstieg die Koloniezahl der drei Konstrukte sogar die des Leervektors. Diese drei Mutanten enthalten nur ein bzw. gar kein *Internal Repeat*.

Die Fähigkeit der DRO1-Deletionskonstrukte, die Bildung der Kolonien wie DRO1-Wildtyp zu unterdrücken, nahm in beiden Zellreihen mit der Länge der Konstrukte zu.

Bei der Analyse der Proteinexpression wurden deutliche Unterschiede für die einzelnen Mutanten festgestellt (s. Abb. 13). Deshalb wurden die Koloniezahlen der Konstrukte auf die Proteinmenge der jeweiligen Mutanten normalisiert.

Mit Hilfe des Programmes Image J (107) wurde die Intensität der Banden für die einzelnen DRO1-Konstrukte im Immunoblot gemessen. Die Werte der mutierten Proteine wurden auf die Aktin-Werten normalisiert, um die Expression untereinander – unabhängig von der Beladung – vergleichen zu können. Anschließend wurden die gezählten Kolonien durch die normalisierten Expressionswerte geteilt (s. Abb. 16 und 17).

A



B

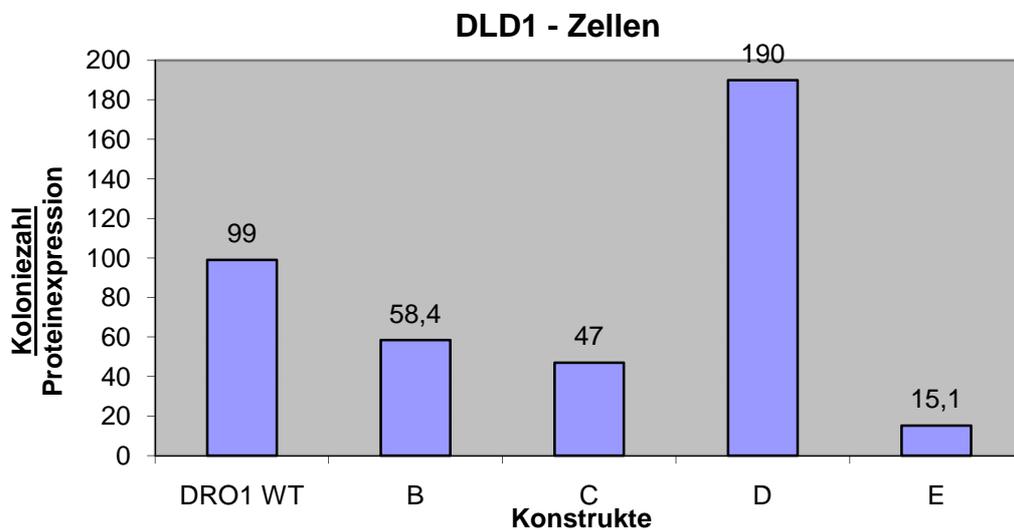
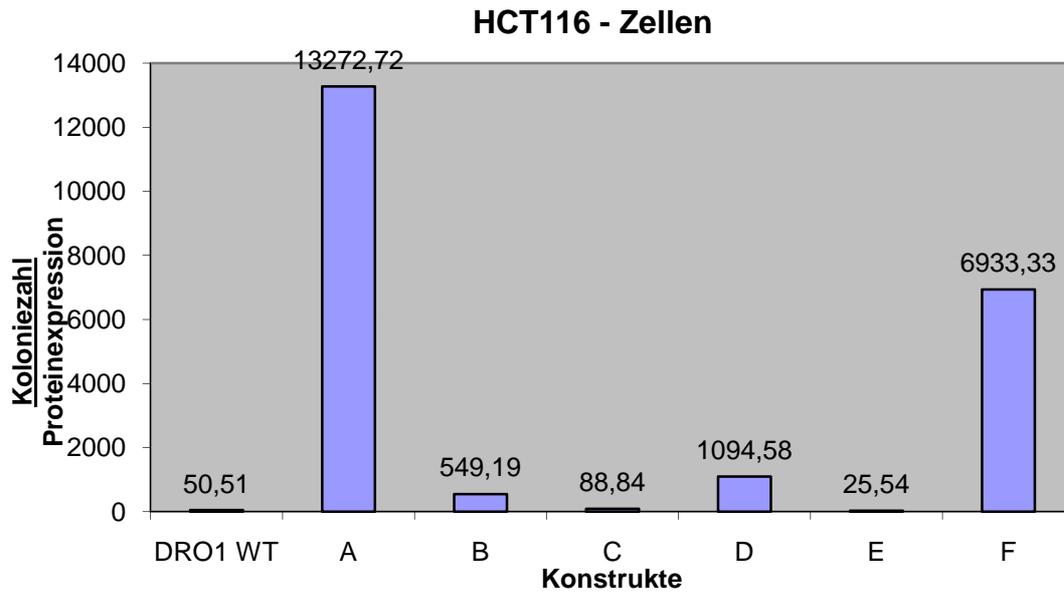


Abb. 16 Einfluss der DRO1-Mutanten in DLD1-Zellen auf die Koloniebildung abhängig von ihrer Proteinexpression

A: Die Expression der DRO1-Konstrukte in DLD1-Zellen wurde mittels Immunodetektion analysiert, quantifiziert und mit den Aktin-Werten normalisiert. Dann wurden die Koloniezahlen auf die DRO1-Expression normalisiert und in der Grafik aufgetragen. **B:** Diagramm ohne die Konstrukte A und F.

A



B

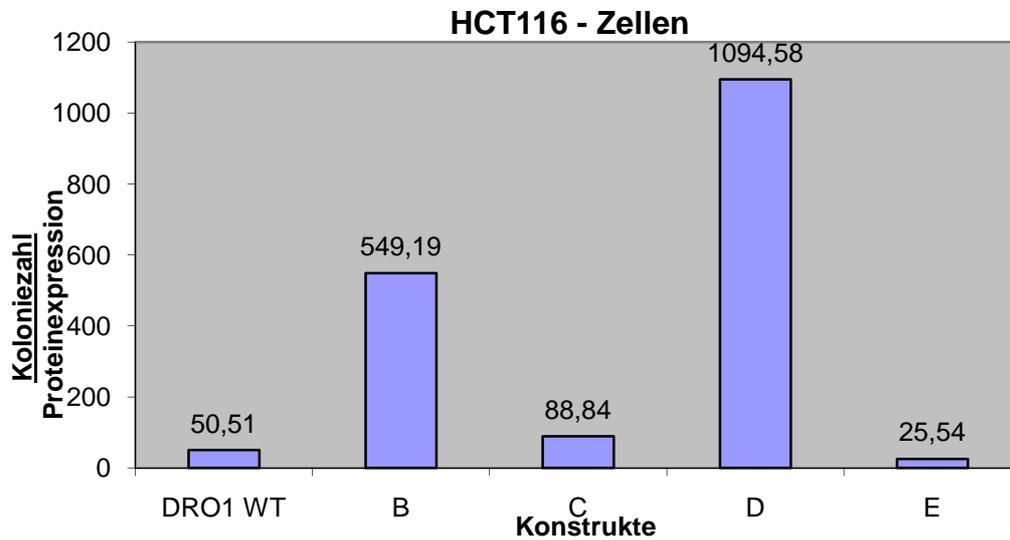


Abb. 17 Einfluss der DRO1-Mutanten in HCT116-Zellen auf die Koloniebildung abhängig von ihrer Proteinexpression

A: Die Expression der DRO1-Konstrukte in HCT116-Zellen wurde mittels Immunodetektion analysiert, quantifiziert und mit den Aktin-Werten normalisiert. Dann wurden die Koloniezahlen auf die DRO1-Expression normalisiert und in der Grafik aufgetragen. **B:** Diagramm ohne die Konstrukte A und F.

Die Diagramme zeigten, dass in DLD1-Zellen die Mutanten B, C und E einen ähnlichen oder sogar stärkeren Effekt als DRO1-WT haben (s.Abb. 16); dies bedeutet, dass diese Konstrukte wie DRO1-WT in der Lage sind, die Koloniebildung zu unterdrücken. Bei den HCT116-Zellen war ein ähnliches Ergebnis zu erkennen, allerdings konnte die Mutante B das Zellwachstum nicht wesentlich reduzieren (s.Abb. 17).

Im Gegensatz dazu waren bei den Mutanten A, D und F in beiden Zelllinien deutlich mehr Kolonien nachweisbar. Besonders für die Mutanten A und F fielen sehr hohe Koloniewerte auf; die wahrscheinlichste Ursache dafür war die viel geringere Proteinexpression dieser beiden Moleküle (s.Abb. 13). Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der Konstrukte B, C, D und E zur besseren Übersicht nochmals gesondert abgebildet (s.Abb. 16B und 17B).

Trotz der geringen Expression zeigte Mutante F, die alle drei *Internal Repeats* enthält und Wildtyp-DRO1 somit am ähnlichsten ist, eine starke Reduktion der Koloniebildung, die mit DRO1-WT vergleichbar war (s.Abb. 14 und 15).

4. Diskussion

Zur kolorektalen Karzinogenese tragen genetische und epigenetische Veränderungen bei, die die Umwandlung von Darmepithelzellen zu Adenokarzinom-Zellen fördern und eine atypische Methylierung von Tumorsuppressorgenen bewirken (76). Die Mehrzahl der spontan auftretenden Karzinome beginnt mit der Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgens, gefolgt von Mutationen des Onkogens K-ras und des Tumorsuppressorgens p53, die die Tumorprogression beschleunigen (81) (86). Die Inaktivierung von APC geht mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors β -Catenin einher (84).

β -Catenin induziert die Expression einiger Protoonkogene, unter anderem von c-Myc, Cyclin D1 und HDAC2. β -catenin kann aber auch die Repression einiger Proteine bewirken (84). Kolligs et al. untersuchten, welche Proteine davon betroffen sind und entdeckten dabei das Molekül DRO1 (*down-regulated by oncogenes*) (84).

Ist DRO1 in Kolonkarzinomzellen stark überexprimiert, hat dies eine erhöhte Sensitivität der Zellen für Apoptose zur Folge (84). Bei Verlust von DRO1 in Krebszellen kann der Tumor allerdings weitgehend ungehindert wachsen und auch das Ansprechen auf Chemotherapeutika ist stark reduziert. DRO1 stellt sich somit als Tumorsuppressorgenkandidat dar, der eine wichtige Rolle in der kolorektalen Karzinogenese spielen könnte.

DRO1 weist im Aufbau und seinen Eigenschaften große Ähnlichkeiten zu anderen Tumorsuppressorgenkandidaten auf, den Molekülen DRS (Mensch), URB (Maus), Equarin-L (Huhn) und CL-2 (Ratte) (84) (89) (91) (94) (108) (95).

DRS-mRNA wurde in den meisten gesunden menschlichen Geweben nachgewiesen, bei vielen Tumoren war die Expression stark vermindert (86). Es hat eine wichtige Funktion bei der durch das endoplasmatische Retikulum- vermittelten Apoptose (86). Wahrscheinlich wird die DRS-Expression von Onkogenen unterdrückt (86).

Das Einschleusen von beispielsweise DRO1 oder DRS in Krebszellen mittels Gen-Therapie könnte in Zukunft ein nützlicher Schritt bei der Behandlung von Krebs sein (86).

Um zu verstehen, wie DRO1 Kolonkarzinomzellen für die Apoptose sensitiviert, wurde zunächst die Wirkung der DRO1-Expression auf verschiedene Apoptosesignalwege untersucht.

4.1 Einfluss von DRO1 auf Moleküle des Apoptosesignalweges

Bei der Bestimmung der Apoptoserate zeigte sich, dass die Expression von DRO1 in den Kolonkarzinom-Zelllinien DLD1 und HCT116 zu einer Steigerung der Rezeptor-vermittelten Apoptose im Vergleich zu Kontrollzellen führte.

Anhand von Zelllysaten wurde dann die Expression der Apoptosemoleküle Caspase-8, FADD, phospho-FADD und FLIP im Western Blot analysiert.

4.1.1 Expression von DRO1 verstärkt die Umwandlung von Caspase-8 in seine aktive Form

Caspase-8 ist die Schlüssel-Initiatorcaspase des extrinsischen Apoptosesignalweges, denn sie stellt eine direkte Verbindung zwischen dem Apoptosesignal am Transmembranrezeptor und der Spaltung und Aktivierung nachgeschalteter Effektorcaspasen dar (8).

Interessant war daher die Fragestellung, ob DRO1 die Expression dieses wichtigen Apoptosemoleküls steigern kann, um dadurch die Fähigkeit zur Apoptose bei Kolonkarzinomzellen zu erhöhen.

Bei allen DLD1/DRO1- und HCT116/DRO1-Zelllysaten wurde die inaktive Procaspase-8 bei 57 kDA detektiert (s. Abb. 8). Zugleich wurde aber deutlich, dass in beiden Zelllinien die Stimulation mit APO zu einer Spaltung der Procaspase und Aktivierung von Caspase-8 führte, die somit den Zelltod induzieren konnte. Bei Zellen, die DRO1 exprimierten, waren die Banden des aktiven Spaltprodukts am deutlichsten zu sehen. Außerdem war zu erkennen, dass bei DRO1-exprimierenden Zellen das Caspase-Signal der inaktiven Vorstufe fast vollständig verschwunden war. Das bedeutet, das apoptotische Signal war in den DRO1-Zellen so stark, dass das Procaspase-8-Molekül beinahe ganz aufgebraucht und gespalten wurde.

Die Behandlung von Zellen mit DRO1 begünstigt folglich die Spaltung von Procaspase-8 in das aktive Caspase-8-Molekül und DRO1 kann dadurch Zellen für apoptotische Vorgänge sensitivieren.

Caspase-8 hat durch die Fähigkeit zur Erhöhung der Apoptoserate eine wichtige Bedeutung für den Verlauf der Karzinogenese (30). Der Verlust von DRO1 in den Kolonkarzinomzellen könnte deshalb zu einer erheblichen Reduzierung des Zelltodes und damit Tumorzellen einen Wachstumsvorteil bieten.

Daher gibt es aktuell Überlegungen, bei Tumorerkrankungen die Caspase-8-Expression und deren Phosphorylierungsstatus zu untersuchen, da beides ein guter prognostischer Marker für

den Krankheitsverlauf sein könnte (29). Außerdem wird versucht, in Krebszellen, bei denen die Caspase-8-Expression stark vermindert wurde, die Aktivität von Caspase-8 beispielsweise durch Demethylierung oder Interferone wieder zu erhöhen (30).

4.1.2 Expression von DRO1 verstärkt die Bildung der aktiven Form von FADD

Da die Caspase-8-Aktivierung vom Adaptermolekül FADD abhängig ist, erschien es sinnvoll, im nächsten Schritt eine mögliche Wirkung von DRO1 auf die FADD-Expression zu untersuchen.

Die wichtigste Aufgabe von FADD besteht darin, den Multiproteinkomplex DISC zu bilden. Dabei verbindet FADD den Todesrezeptor mit der Initiatorcaspase-8 (37), ist selbst jedoch nicht enzymatisch aktiv (35).

Bei der Immunodetektion (s. Abb. 9) zeigte sich das aktive FADD-Signal mit einer Größe von 27 kDa hauptsächlich bei den apoptotischen Zellen. Bei den übrigen Lysaten ist FADD somit größtenteils nicht aktiviert worden.

Es konnte dadurch gezeigt werden, dass unter Einfluss von DRO1 verstärkt aktives FADD gebildet wird. Somit wäre es möglich, dass die erhöhte Caspase-8-Expression bei Zellen mit DRO1 letztendlich durch das vermehrte Vorhandensein von FADD-Molekülen erreicht wird.

Auffallend war bei der Immunodetektion allerdings das Vorhandensein weiterer Banden bei etwa 60 kDa, die überwiegend bei den unstimulierten Zellen zu erkennen waren (s. Abb. 9). Das Signal verlief komplementär zum 27 kDa-Fragment, das bedeutet, je schwächer die Bande bei 60 kDa war, desto stärker trat das Signal für das aktive FADD-Molekül bei 27 kDa in Erscheinung. Diese Tatsache würde – vergleichbar mit Caspase-8 – für eine inaktive Vorläuferstufe von FADD sprechen. Es wäre möglich, dass FADD inaktiv als Dimer vorliegt (~60 kDa) und dann in zwei aktive FADD-Moleküle mit einem Molekulargewicht von je 27 kDa gespalten wird (46).

Zhang et al. beschreiben in einem Artikel verschiedene FADD-Formen, für deren Detektion spezifische Antikörper bei der Immunodetektion benötigt werden (46). Dabei unterscheiden sie monomeres, nicht phosphoryliertes FADD von monomerem phosphoryliertem FADD und auch dimeres un- bzw. phosphoryliertes FADD (46).

Mit dem FADD- Antikörper (BioVision) konnten Zhang et al. in 293T-Zellen FADD mit einer Größe von 60 kDa und 30 kDa nachweisen. Wurden die Zellen stark denaturiert, konnten nur die 30 kDa-Monomere nachgewiesen werden. Das 60 kDa schwere Molekül deuten Zhang et al. als FADD-Dimer, das ebenso wie das monomere, nicht-phosphorylierte FADD überwiegend im Zytoplasma zu finden ist (46). Bei Stimulation mit TNF α und

Actinomycin D zeigte sich zwar eine erhebliche Steigerung der monomeren unphosphorylierten FADD-Menge, jedoch blieb die Konzentration des FADD-Dimers konstant. Das im Nukleus gelegene phosphorylierte FADD wurde durch die Stimulation reduziert (46).

Diese Beobachtungen von Zhang et al. legen nahe, dass das FADD-Monomer bei apoptotischen Stimuli vermehrt bereitgestellt wird; dies könnte z.B. durch Dephosphorylierung des nukleären FADD geschehen. Die Beobachtung von Zhang, dass sich die Menge an FADD-Dimer nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Reagenzien nicht verändert, konnte ich bei meinen Versuchen allerdings nicht bestätigen, da bei Zugabe von APO das Vorhandensein an FADD-Dimer eindeutig reduziert wurde. Dies spricht für eine Spaltung des FADD-Dimers in aktive FADD-Monomere.

Letztendlich ist die Funktion des FADD-Dimers nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise kann es die Apoptose triggern; oder aber die Dimerisierung und Verknüpfung der FADD-Moleküle an ihren Todesdomänen DED ist für die Interaktion von FADD und dem TNF-Rezeptor notwendig (46). Das Ergebnis dieses Versuches stimmt allerdings vollkommen mit der Feststellung von Zhang überein, dass vorherrschend die Konzentration des monomeren FADD während der Apoptose gesteigert ist. Diese Beobachtung würde darauf hindeuten, dass monomeres FADD für die Funktion des DISC-Komplexes und den Ablauf der Apoptose wichtig ist.

Das Interesse am FADD-Molekül und, damit verbunden, an der Förderung der DRO1-Expression könnte in Zukunft wohl noch weiter steigen, da bereits festgestellt wurde, dass eine Expressionssteigerung von FADD die Sensitivierung von Zellen gegenüber Chemotherapie erhöhen kann (36).

4.1.3 Expression von DRO1 bewirkt keine Zunahme der Menge an phosphoryliertem FADD

Nachdem eine Veränderung der FADD-Aktivität durch DRO1 nachgewiesen werden konnte, blieb nun zu klären, ob DRO1 auch den Phosphorylierungsstatus von FADD beeinflussen kann.

FADD kann am Ser194 phosphoryliert werden und beeinflusst dadurch das Fortschreiten des Zellzyklus (39) (49). Es kann den NF- κ B-Signalweg aktivieren, was zu einer Verschlechterung des klinischen Outcomes führt (54). Phosphoryliertes FADD ist im Gegensatz zum monomeren FADD unfähig, Apoptose zu induzieren.

Es wäre daher zu erwarten, dass DRO1 die Expression von pFADD reduziert, um den Apoptosevorgang nicht aufzuhalten.

Nach langer Belichtungszeit (60 Minuten) konnte zumindest für die DLD1-Zellen ein Signal, das phospho-FADD der Größe nach entspricht, detektiert werden (s. Abb. 10). Allerdings war kein Unterschied in der Signalstärke bei 28 kDa zu erkennen und somit ist es unwahrscheinlich, dass DRO1 die Expression von phosphoryliertem FADD beeinflussen kann. Das Experiment wurde auch mit HCT117/DRO1-Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt), dabei konnten jedoch bei 28kDa keine Signale detektiert werden.

4.1.4 Expression von DRO1 hat einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von FLIP

Neben FADD ist auch FLIP ein wichtiges Regulator-Protein im extrinsischen Apoptosesignalweg, da es den Zelltod durch Steuerung der Caspase-8-Aktivität sowohl hemmen als auch fördern kann (11). Die kurze Spleißvariante FLIP_S inhibiert die Caspase-8-Aktivierung (35). In physiologischen Mengen fördert die lange FLIP_L-Form die Apoptose, bei erhöhter Konzentration wirkt es inhibitorisch (35) (61).

Bei der Immunodetektion konnten bei DLD1- und bei HCT116-Zellen FLIP_S bei 28 kDa und FLIP_L bei 55 kDa detektiert werden (s. Abb. 11). Die Re-Expression von DRO1 in den DLD1-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation der Todesrezeptoren führte zu einer Abnahme des Apoptose-hemmenden FLIP_S-Signals im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Dies bedeutet, dass DRO1 die FLIP_S-Expression hemmen kann, um den Apoptosevorgang zu steigern. Leider zeigte sich für HCT116-Zellen nach DRO1-Expression ein indifferentes Bild. Ähnlich wie bei FLIP_S führten die Expression von DRO1 und die simultane Apoptose-Induktion in DLD1- und HCT116-Zellen zu einer Abnahme des FLIP_L-Signals (55kDa). Diese Ergebnisse implizieren, dass die Reduktion der FLIP_L-Expression möglicherweise notwendig für den Ablauf der Apoptose in diesen Zellen war.

In diesen „FLIP“-Western-Blots waren zusätzlich bei ca. 40 kDa schwache Banden zu erkennen, die ein Spaltprodukt von FLIP_L darstellen könnten. Irmeler et al. beschreiben die Entstehung eines 43 kDa großen FLIP-Moleküls (58). Es entsteht z.B. bei Überexpression von FLIP in 293T-Zellen; dabei werden von FLIP_L am C-Terminus einige Basenpaare abgetrennt, indem es nach Asp 376 gespalten wird (58). Auch bei Yang ist dieses Fragment erwähnt (59); zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges, muss c-FLIP_L bei Asp 376 gespalten werden. Dabei entstehen p43FLIP (43kDa) und p22 FLIP (22kDa) (59).

FLIP ist ein bedeutendes Zielmolekül für die Therapie von Tumorerkrankungen, weil in vielen Krebszellen die Expression von FLIP stark erhöht ist und die Zellen dabei häufig

resistent gegenüber apoptotischen Signalen sind (59). Zur Diskussion steht die Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden und „*small molecule inhibitors*“, die die FLIP-mRNA und das FLIP-Protein beeinflussen sollen (59). Ebenso könnte durch eine erhöhte DRO1-Expression die Menge an antiapoptotisch wirkendem FLIP reduziert und so das Ansprechen auf apoptotische Signale verbessert werden.

DRO1 kann folglich die Expression einiger Apoptosemoleküle des extrinsischen Apoptosesignalweges, wie Caspase-8 und FADD und FLIP, so verändern, dass die Kolonkarzinomzelllinien DLD1 und HCT116 vermehrt in Apoptose gehen.

4.2 Bedeutung der DRO1-Struktur für die Tumorsuppression

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, welche Strukturen und Proteindomänen von DRO1 für dessen tumorsupprimierende Wirkung verantwortlich sind. Dazu wurden sechs Deletionskonstrukte erstellt, die entweder am amino- oder am carboxyterminalen Ende verkürzt worden sind und sich in der Gesamtlänge und in der Anzahl der enthaltenen *Internal Repeats* unterschieden.

Ziel war es, herauszufinden, ob bestimmte Domänen für die tumorsupprimierende Funktion verantwortlich sind. Von besonderem Interesse waren dabei die hochkonservierten Regionen – die *Internal Repeats* 1, 2 und 3. Auch aufgrund der großen Ähnlichkeit der *Repeats* zu einem bestimmten Genabschnitt des Tumorsuppressors DRS schienen diese eine funktionell sehr wichtige Region darzustellen (84).

4.2.1 Deletionskonstrukte des Tumorsuppressorkandidaten DRO1

In den *Colony Forming Assays* (s.Abb. 14-17) konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte C, E und F ähnlich wie DRO1-WT die Koloniebildung unterdrücken können. Dies ist insbesondere deshalb interessant, da die Mutanten C und E nur zwei der insgesamt drei in DRO1 enthaltenen *Internal Repeats* aufweisen.

Beim Vergleich der carboxyterminal verkürzten DRO1-Mutanten B und C besitzt die Mutante C zusätzlich einen *Internal Repeat*, IR2, und zeigt einen deutlich hemmenden Effekt auf das Koloniewachstum. Dies bedeutet, dass IR2 entweder alleine oder in Kombination mit IR1 die Koloniebildung wesentlich unterdrücken kann. Bei den durch aminoterminalen Verkürzung

enstandenen Mutanten D und E weist das Konstrukt E einen stärkeren Effekt auf die Koloniebildung auf als Mutante D. Zusätzlich unterscheiden sich diese beiden Konstrukte dadurch, dass Mutante E neben IR3 noch IR2 enthält. Auch diese Daten deuten daraufhin, dass IR2 entweder alleine oder in Kombination mit IR3 für diesen wachstumshemmenden Effekt verantwortlich ist.

Der Vergleich dieser vier DRO1-Konstrukte unterstützt die Hypothese, dass das *Internal Repeat 2* für die DRO1-Funktion besonders wichtig zu sein scheint, sei es alleine oder in Kombination mit IR1 oder IR3. Gemessen am biologischen Effekt im *Colony Forming Assay* scheint die Kombination aus IR2 und IR3 dabei noch eine größere Bedeutung als IR1 zusammen mit IR2 zu haben. Dafür könnten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen IR2 und IR3 verantwortlich sein (89).

Trotz der geringen Expression (s. Abb. 13) zeigte die Mutante F eine starke Reduktion der Koloniebildung, die mit DRO1-WT vergleichbar war. Dennoch könnte die Mutante F aufgrund der erheblichen Molekülgröße ein instabiles Protein sein. Für die Mutante A lassen sich keine Rückschlüsse auf die Aktivität ziehen. Dieses Konstrukt könnte eine geringe intrinsische biologische Aktivität besitzen oder die Proteinexpression war zu gering.

Bei Mutante E konnten sowohl bei DLD1-Zellen, als auch bei HCT116-Zellen zwei Banden bei der Immunodetektion nachgewiesen werden (s. Abb. 13). Die untere Bande entsprach mit 38 kDa der erwarteten Größe. Es ist möglich, dass die obere Bande einem durch Ubiquitylierung oder Glycosylierung modifiziertem Konstrukt E entspricht.

Um noch präzisere Aussagen über die einzelnen Proteinabschnitte machen zu können, müssten in folgenden Versuchen weitere Mutanten erstellt werden. Dabei könnte z.B. IR1 mit IR3 kombiniert werden. Auch die Untersuchung von IR2 alleine könnte sehr interessant sein oder aber man trennt den Carboxyterminus hinter IR3 ab und beobachtet, wie sich dann das Zellwachstum verändert. Der Aufbau und die Bedeutung der *Coiled-coil*-Region und natürlich eine genauere Analyse der *Internal Repeats* durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren im Kontext des DRO1-WT-Moleküls könnten ebenso von großem Interesse sein.

4.2.2 Deletionskonstrukte des Tumorsuppressorgens DRS

In zwei Studien zur Beschreibung des Tumorsuppressorgens DRS, das dem Aufbau von DRO1 sehr ähnlich ist, wurden ebenfalls Deletionskonstrukte von DRS erzeugt (88) (89). Bei Yamashita et al. wurden drei Mutanten erstellt (88) (s. Abb. 4); die erste Mutante (CD) wurde an der C-terminalen Region um 19 Aminosäuren gekürzt, bei der nächsten (TM) fehlte die

komplette C-terminale Region und zudem noch ein Teil der Transmembrandomäne, und beim dritten Konstrukt (ND) wurde ein großer Teil des Mittelstücks inklusive der *Sushi-Repeats* entfernt (s. Abb.4) (88). Die Arbeitsgruppe war vor allem an der Unterdrückung des Verankerungs-unabhängigen Wachstums interessiert. Daher wurden die Deletionskonstrukte in eine Blasenkrebszelllinie transfiziert, bei der mit DRS-Wildtyp die Anoikis am besten erkennbar war (88). Anschließend wurde ein *Colony Forming Assay* durchgeführt (88). Yamashita et al. kamen zu dem Schluss, dass keine der drei Mutanten die Koloniebildung so unterdrücken kann, wie der DRS-Wildtyp (88). Sowohl die N- als auch die C-terminale Region und die *Repeats* sind für die tumorsupprimierende Funktion notwendig. Dies ist vor allem bei der Mutante CD erstaunlich, da sie ja nur um 19 Aminosäuren gekürzt wurde, diese Basenpaare aber wahrscheinlich die Funktion des *Internal Repeat* beeinträchtigen. Bei der ND-Mutante war die Koloniezahl sogar um das 2,5-fache erhöht, so dass ohne die *Sushi-Repeats* überhaupt kein wachstumshemmender Effekt zu erwarten ist (88).

In der Studie von Tambe et al. wurden nur zwei Deletionskonstrukte erstellt (89). Diese sind mit den Konstrukten CD und ND von Yamashita et al. vergleichbar. Auch hier zeigte sich das gleiche Resultat, nämlich dass die drei *Sushi-Repeats* und die C-terminale Region für die Hemmung der Koloniebildung notwendig sind (89) (s. Abb.4).

In beiden Studien war der Umfang des Experiments mit zwei bzw. drei Konstrukten relativ klein. Außerdem gaben sie keinen genauen Aufschluss über die Bedeutung jedes einzelnen der drei *Sushi-Repeats*.

Überträgt man die erworbenen Erkenntnisse auf die Konstrukte, die für diese Doktorarbeit in den Experimenten gewählt wurden, wäre wohl am ehesten zu erwarten gewesen, dass auch hier keine Mutante den Effekt von DRO1-Wildtyp erzielt. Allerdings muss beachtet werden, dass DRS nur ein *Internal Repeat* am C-Terminus enthält, wohingegen DRO1 drei *Repeats* an verschiedenen Stellen des Gens besitzt. Und gerade diesen hochkonservierten Bereichen wird eine entscheidende Funktion zugeschrieben. Daher ist es bei DRO1 möglich, dass bereits ein (IR2) oder zwei *Repeats* die Koloniebildung hemmen können.

4.2.4 Ausblick

Durch die bisher durchgeführten Experimente konnten in dieser Doktorarbeit einige neue Erkenntnisse über den Tumorsuppressorgenkandidat DRO1 gewonnen werden. Diese bieten nun andere interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen:

Es wurde herausgefunden, dass DRO1 die Expression der Apoptosemoleküle Caspase-8, FADD und FLIP beeinflussen kann und somit eine vermehrte Apoptoserate der

Kolonkarzinomzellen erzielt. Aber in welcher Weise bewirkt DRO1 die Expressionsveränderung und damit die Sensitivierung der Zellen für apoptotische Stimuli? Setzt DRO1 verschiedene Mediatoren frei, die die Apoptosevorgänge fördern oder kann es die Enzymaktivität für z.B. die Caspase-8-Spaltung steigern? Binden spezifische Enhancer oder Repressoren an die DNA, um die Biosynthese bestimmter Proteine zu erhöhen oder zu unterbinden?

Durch eine Mutationsanalyse des DRO1-Gens konnte anhand einiger Deletionskonstrukte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von nur zwei statt drei *Internal Repeats* ausreichend ist, das Wachstum von Kolonkarzinomzellen zu reduzieren.

Ein weiterer wichtiger und interessanter Ansatz wäre, zu untersuchen, wie die DRO1-Expression selbst reguliert wird und wie sie bei einigen Tumorzellen unterdrückt werden kann. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse könnte dann vielleicht ermöglicht werden, DRO1 in Krebszellen, in denen die Expression supprimiert war, wieder zu aktivieren und somit das Tumorstadium zu unterbinden.

Das Erreichen neuer Erkenntnisse über DRO1 scheint lohnenswert, da sowohl für die kolorektale Karzinomentstehung, als auch für die Entwicklung neuer Therapiestrategien DRO1 ein vielversprechendes und hochinteressantes Molekül ist.

5. Zusammenfassung

Im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese kommt es typischerweise zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens APC und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors β -catenin. β -catenin induziert die Expression einiger Protoonkogene, unter anderem c-Myc, Cyclin D1 und HDAC2. Aber β -catenin bewirkt ebenso die Repression einiger Proteine, darunter auch des Moleküls DRO1 (*down-regulated by oncogenes*). DRO1 weist eine große Homologie zu dem Tumorsuppressorgenkandidaten DRS auf; DRS besitzt bei der durch das endoplasmatische Retikulum-vermittelten Apoptose eine wichtige Funktion. Ist DRO1 in Kolonkarzinomzellen stark überexprimiert, hat dies eine erhöhte Sensitivität der Zellen für Apoptose-Stimuli zur Folge.

Um zu verstehen, wie DRO1 in Kolonkarzinomzellen zu einer gesteigerten Sensitivierung für die Rezeptor-vermittelte Apoptose beiträgt, wurde der Einfluss von DRO1 auf die Expression verschiedener Apoptosemoleküle untersucht.

Zunächst wurden die Kolonkarzinomzelllinien DLD1 und HCT116 mit Doxyzyklin-induzierbaren DRO1-Expressionskonstrukten stabil transfiziert. Die Expression von DRO1 in den stabil transfizierten Zelllinien wurde über das Epitop-Tag Hemagglutinin nachgewiesen. Die DLD1 DRO1- und HCT116 DRO1-Zellen wurden mit Doxyzyklin behandelt. Anschließend wurde der aktivierende CD95-Antikörper APO zugegeben, um die Apoptose zu induzieren. Totale Zelllysate wurden erstellt und die Expression der Apoptosemoleküle Caspase-8, FADD, phospho-FADD und FLIP im Western Blot analysiert.

Dabei konnte man feststellen, dass DRO1 die Umwandlung von Caspase 8 in seine aktive Form erheblich begünstigt. Zusätzlich bewirkt DRO1 eine verstärkte Expression der aktiven FADD-Isoform. Bei phosphoryliertem FADD konnte dagegen durch DRO1 kein Einfluss auf die Expression hervorgerufen werden. Aber die Aktivität des Apoptoseinhibitors FLIP wurde durch die Expression von DRO1 erheblich gehemmt.

DRO1 kann folglich die Expression einiger Apoptosemoleküle so beeinflussen, dass Kolonkarzinomzelllinien vermehrt den programmierten Zelltod durchlaufen.

Zusätzlich sollte die Bedeutung der drei *Internal Repeats* und die Struktur von DRO1 genauer untersucht werden. Da die *Repeats* hochkonservierte Bereiche sind und eine große Ähnlichkeit zu einem bestimmten Element von DRS besitzen, waren sie von besonderem Interesse. Es wurden sechs DRO1- Deletionskonstrukte erstellt, drei aminoternale und drei carboxyterminale, die sich in ihrer Größe und der Anzahl der enthaltenen *Repeats* unterscheiden. Die Mutanten wurden in einen Expressionsvektor kloniert und in die

Kolonkarzinomzelllinien DLD1 und HCT116 transfiziert. In *Colony Forming Assays* wurde die Koloniebildung beurteilt und mit der Expression im Western Blot verglichen.

In diesem Experiment zeigte sich, dass auch Mutanten, die nur zwei *Internal Repeats* enthalten, die tumorsupprimierende Wirkung von DRO1-Wildtyp erzielen können. Auch das alleinige Vorhandensein von IR2 könnte bereits ausreichend sein, um das Wachstum von Karzinomzellen einzuschränken.

DRO1 stellt sich somit als Tumorsuppressorgenkandidat dar, der Zellen für die Rezeptorvermittelte Apoptose sensitiviert. Der Verlust der DRO1-Expression bietet Tumorzellen folglich einen Selektionsvorteil und hat daher eine wichtige Bedeutung in der kolorektalen Karzinogenese.

6. Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Doktorarbeit unterstützt haben:

Zunächst vielen Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Kolligs für die Überlassung dieses interessanten Themas, die intensive Betreuung bei der Durchführung der Dissertation und vor allem die schnelle Hilfe bei Fragen und Problemen.

Ganz besonders danke ich auch Herrn Dr. A. Herbst für die ausführliche Einarbeitung in das Themengebiet und dessen praktische Durchführung, die sehr gute Betreuung, die vielen Hilfestellungen während der gesamten Zeit und vor allem für seine große Geduld.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten AG Kolligs, besonders Andrea Ofner und Isabella Wolf, die mich sehr bei der Durchführung der Versuche unterstützt haben, bei vielen Unklarheiten helfen konnten und immer zu einer netten und unterhaltsamen Atmosphäre im Labor beigetragen haben. Danke auch an meine Mit-Doktorandin und liebe Freundin Claudia Wypior für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch bei meiner gesamten Familie bedanken, die mir das Studium und das Erstellen dieser Doktorarbeit überhaupt ermöglicht hat. Danke vor allem für die ermutigenden und die lieben Worte zur rechten Zeit.

7. Literaturverzeichnis

1. **Schoppmeyer, Konrad, Spieker, Henning und Mössner, Joachim.** Vorsorgemuffel oder Screeningversager? *Deutsches Ärzteblatt*. 20. März 2009, 12, S. 195-201.
2. **Herold, Gerd und Mitarbeiter.** *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Köln : Herold, Gerd, 2010. S. 473-479.
3. **Böcker, W., Denk, H. und Heitz, U.Ph.** *Pathologie*. [Hrsg.] Böcker W., Denk H. und Heitz Ph. U. 3. Auflage. München/ Jena : Elsevier; Urban & Fischer, 2004. S. 742-743.
4. **Schalhorn, A, et al.** Kolonkarzinome. [Hrsg.] Tumorzentrum München. *Manual Gastrointestinale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 6.Auflage. München : Zuckschwerdt, 2001, S. 215-243.
5. **Classen, M, Diehl, V und Kochsiek, K.** *Innere Medizin*. [Hrsg.] W. E. Berdel, M. Böhm und W. Schmiegel. 5.Auflage. München/ Jena : Urban & Fischer, 2004. S. 1236-1241.
6. **Siebeck, M., Aust, D. und u.a.** Rektumkarzinome. [Hrsg.] Tumorzentrum München. *Manual. Gastrointestinale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 6. Auflage. München : Zuckschwerdt, 2001, S. 244-265.
7. **Stintzing, S., et al.** Behandlung des kolorektalen Karzinoms mit monoklonalen Antikörpern. *Deutsches Ärzteblatt*. 20. März 2009, Bd. 106, 12, S. 202-206.
8. **Karp, G.** *Molekulare Zellbiologie*. [Hrsg.] S. Wolf. s.l. : Springer, 2005. S. 816-821.
9. **Alberts, B, Johnson, A und Lewis, J.** *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. s.l. : Wiley-Vch, 2005. S. 1174-1186.
10. **Löffler, G, Petrides, P und Heinrich, P.** *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage. 2007. S. 225-228;.
11. **Degterev, A, Boyce, M und Junying, Y.** A decade of caspases. *Oncogene*. 22, 2003, S. 8543-8567.
12. **Lodish, et al.** *Molecular Cell Biology*. s.l. : W.H. Freeman and Company, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.section.6889>.
13. **Ssang-Goo, C und Eui-Ju, C.** Apoptotic Signaling Pathways: Caspases and Stress-Activated Protein Kinases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 35, January 2002, Bd. No.1, S. 24-27.
14. http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Apoptosis_Overview.jsp. [Online] 2007.
15. **Fuentes-Prior, P. und Salvesen, G.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemichal Journal*. 2004, 384, S. 201-232.

16. **Fischer, U., Jänicke, R. und Schulze-Osthoff, K.** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* . 10, 2003, S. 76-100.
17. **Hengartner, M.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407, 12. October 2000, S. 770-776. Insight review articles.
18. **Pop, C, et al.** Role of Proteolysis in Caspase-8 Activation and Stabilization. *Biochemistry*. 10. April 2007, S. 4398-407.
19. **Yan, N und Shi, Y.** Mechanisms of Apoptosis Through Structural Biology. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 5. May 2005, Bd. 21, S. 35-56.
20. **Takikawa, Y., et al.** The Bile Acid-Activated Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Inhibits Fas Apoptosis Upstream of Bid in Rodent Hepatocytes. *Gastroenterology*. 120, 2001, S. 1810-1817.
21. **Fanzo, J., et al.** CD95 Rapidly Clusters in Cells of Diverse Origins. *Cancer Biology & Therapy*. 2:4, July/August 2003, S. 392-395.
22. **Valmiki, M. und Ramos, J.** Death Effector Domain-Containing Proteins . *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66, 2009, S. 814-830.
23. **Baumgartner, H., et al.** Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is dependent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 293, 12. April 2007, S. G296-G307.
24.
http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Apoptosis_MitochondrialControlOfApoptosis.js
 p. [Online] 2007.
25. **Fulda, S.** Inhibitor of apoptosis proteins as targets for anticancer therapy. *Future Drugs*. 2007, S. 1255-1264. Expert Rev. Anticancer Ther. 7 (9).
26. **Higuchi, H., Bronk, S. und Y., Takikawa.** The Bile Acid Glycochenodeoxycholate Induces TRAIL-Receptor 2/DR5 Expressio and Apoptosis. [Hrsg.] The American Society of Biochemistry and Molacular Biology. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 42, 19. October 2001, S. 38610-38618.
27. **Cowling, V. und Downward, J.** Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Difference*. 9, 2002, S. 1046-1056.
28. **Sohn, D., Schulze-Osthoff, K. und Jänicke, R.** Caspase-8 Can Be Activated by Interchain Proteolysis without Receptor-triggered Dimerization during Drug-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 18. February 2005, Bd. 7, S. 5267-5273.
29. **Frisch, S.** Caspase-8: Fly or Die. *Cancer Research*. 68, 15. June 2008, Bd. 12, S. 4491-4493.
30. **Fulda, S.** Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Letters*. 281, 2009, S. 128-1133.

31. **Kruidering, M. und Evan, G.** Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? *IUBMB Life*. 50, 2000, S. 85-90.
32. **Maelfait, J. und Beyaert, R.** Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochemical Pharmacology*. 76, 2008, S. 1365-1373.
33. **Lemmers, B., et al.** Essential Role for Caspase-8 in Toll-like Receptors and NFkB Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 9. March 2007, Bd. 10, S. 7416-7423.
34. **Varfolomeev, E., et al.** Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1 and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 9, 1998, Bd. 2, S. 267-276.
35. **Tibbetts, M., Zheng, L. und Lenardo, M.** The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nature Immunology*. 4, May 2003, Bd. 5, S. 404-409.
36. **Yin, A., et al.** Overexpression of FADD enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells. *Med Oncol*. DOI 10.1007/s12032-009-9244-x, 05. May 2009.
37. **Hughes, M., Harper, N., et al.** Reconstitution of the Death-Inducing Signaling Complex Reveals a Substrate Switch that Determines CD95-Mediated Death or Survival. *Molecular Cell*. 35, 14. August 2009, S. 265-279.
38. **Werner, M., Wu, C. und Walsh, C.** Emerging Roles for the Death Adaptor FADD in Death Receptor Avidity and Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle*. 5:20, 15. October 2006, S. 2332-2338.
39. **Zhang, J., Zhang, D. und Hua, Z.** FADD and its Phosphorylation. *IUBMB Life*. 56(7), July 2004, S. 395-401.
40. **Garcia-Fuster, M., et al.** Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: Functional interactions with casein kinase Ia, Ga proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology*. 55, 2008, S. 886-899.
41. **Thorburn, A.** Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*. 16, 2004, S. 139-144.
42. **Walczak, H. und Krammer, P.** The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) Apoptosis Systems. *Experimental Cell Research*. 256, 2000, S. 58-66. Minireview.
43. **Hyer, M., Samuel, T. und Reed, J.** The FLIP-Side of Fas Signaling. *Clinical Cancer Research*. 12(20), 15. October 2006, S. 5929-5931.
44. **Young-Joo, K., Hak Cheol, K. und Hyeonseok, K.** Anti-tumor Activity of the Ginsenoside Rk1 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Inhibition of Telomerase Activity and Induction of Apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.* 31 (5), 2008, S. 826-830.

45. **Tourneur, L., et al.** Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome. *Cancer Research*. 64, 2004, S. 8101-8108.
46. **Zhang, X., et al.** Changes in FADD levels, distribution, and phosphorylation in TNFalpha-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-3, caspase-8 and BID dependent . *Apoptosis*. 13, 2008, S. 983-992.
47. **Gomez-Angelats, M. und Cidlowski, j.** Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death Differ*. 10, 2003, S. 791-797.
48. **Sheikh, M. und Huang, Y.** The FADD is Going Nuclear. *Cell Cycle*. 2:4, July/August 2003, S. 346-347.
49. **Scaffidi, C., et al.** Phosphorylation of FADD/MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *Journal of Immunology*. 164, 2000, S. 1236-1242.
50. **Rochat-Steiner, V., et al.** FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation . *Journal of Experimental Medicine*. 192, 2000, S. 1165-1174.
51. **Matsuyoshi, S., et al.** FADD phosphorylation is critical for cell cycle regulation in breast cancer cells. *British Journal of Cancer*. 94(4), 2006, S. 532-539.
52. **Alappat, E., et al.** Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKIalpha regulates its nonapoptotic activities. *Molecular Cell*. 19, 2005, S. 321-332.
53. **Chen, G., et al.** Phosphorylated FADD induces NF-kappaB, pertubs cell cycle and is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102, 2005, S. 12507-12512.
54. **Bhojani, M., et al.** Nuclear Localized Phosphorylated FADD Induces Cell Proliferation and is Associated with Aggressive Lung Cancer. *Cell Cycle* . 4:11, November 2005, S. 1478-1481.
55. **Li, F., et al.** Crystal Structure of a Viral FLIP. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 3. February 2006, Bd. 5, S. 2960-2968.
56. **Ueffing, N., et al.** A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein . *Blood*. 10, 13. May 2009, Bd. 1182.
57. **Kataoka, T., et al.** The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kB and Erk signaling pathways. *Current Biology*. 10, 16. May 2000, Bd. 11, S. 640-648.
58. **Irmeler, M., et al.** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 388, 10. July 1997, S. 190-195.
59. **Yang, J.** FLIP as an Anti-Cancer Therapeutic Target. *Yonsei Med J*. 49(1), 2008, S. 19-27.

60. **Djerbi, M., et al.** Characterization of the human FLICE-inhibitory-protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms . *Scand J Immunol.* 54, 2001, S. 180-189.
61. **Chang, D., et al.** c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO Journal.* 21, 2002, Bd. 14, S. 3704-3714.
62. **Budd, R., Yeh, W. und Tschopp, J.** cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature.* 6, March 2006, S. 196-204.
63. **Kim, S., et al.** Overexpression of cFLIPs Inhibits Oxaliplatin-Mediated Apoptosis Through Enhanced XIAP Stability and Akt Activation in Human Renal Cancer Cells . *Journal of Cellular Biochemistry.* 105, 2008, S. 971-979.
64. **Jin, T., et al.** Fas-associated Protein with Death Domain (FADD)-independent Recruitment of c-FLIPL to Death Receptor 5. *The Journal of Biological Chemistry.* 279, 31. December 2004, Bd. 53, S. 55594-55601.
65. **Evan, G. und Vousden, K.** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 411, 17. May 2001, S. 342-348.
66. **Löffler, G.** *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2008. S. 479-484. 7.Auflage.
67. **Compagni, A. und Christofori, G.** Recent advances in research on multistage tumorigenesis . *British Journal of Cancer.* 83, 2000, Bd. 1, S. 1-5.
68. **Lowe, S. und Lin, A.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21, 2000, Bd. 3, S. 485-495.
69. **Blagosklonny, M.** Molecular Theory of Cancer. *Cancer Biology and Therapy.* 4:6, June 2005, S. 621-627.
70. **Efeyan, A., et al.** Genetic dissection of the role of p21Cip1/Waf1 in p53-mediated tumour suppression. *Oncogene.* 26, 2007, S. 1645-1649.
71. **Hanahan, D. und Weinberg, R.** The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 100, 7. January 2000, S. 57-70.
72. **Thompson, C.** Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science.* 267, 10. March 1995, S. 1456-1462.
73. **Hersey, P. und Zhang, X.** Overcoming Resistance of Cancer Cells to Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology.* 196, 2003, S. 9-18.
74. **Ashkenazi, A.** Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 19, 2008, S. 325-331.
75. **Counter, C., et al.** Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells wick express telomerase activity. *EMBO Journal.* 11, 1992, S. 1921-1929.

76. **Grady, W. und Carethers, J.** Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 135, 2008, S. 1079-1099.
77. **Eckelmann, BP., Salvesen, GS. und Scott, FL.** Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*. 7, 2006, S. 988-994.
78. **Liston, P., Fong, WG. und Kelly, NL.** Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-caspase activity. *Nature Cell Biology*. 3, 2001, S. 128-133.
79. **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. [Hrsg.] The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 20. August 2004, Bd. 34, S. 35829-35839.
80. **Zhang, L., et al.** Accelerated Degradation of Caspase-8 Protein Correlates with TRAIL Resistance in a DLD1 Human Colon Cancer Cell Line. *Neoplasia*. 7, June 2005, Bd. 6, S. 594-602.
81. **Kolligs, F., Bommer, G. und Göke, B.** Wnt/Beta-Catenin/Tcf Signaling: A Critical Pathway in Gastrointestinal Tumorigenesis. *Digestion*. 66, 2002, S. 131-144.
82. **Sarela, A., et al.** Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut*. 46, 2000, S. 645-650.
83. **Stein, U., et al.** MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nature Medicine*. 15(1), January 2009, S. 59-67.
84. **Bommer, G., et al.** DRO1, a Gene Down-regulated by Oncogenes, Mediates Growth Inhibition in Colon and Pancreatic Cancer Cells. [Hrsg.] The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of Biological Chemistry*. 4. March 2005, 280, S. 7962-7975.
85. **Mukaisho, K., et al.** Down-regulation of drs mRNA in colotectal neoplasms. *Jpn J Cancer Res*. 93(8), August 2002, S. 888-893.
86. **Shimakage, M., et al.** Down-regulation of drs mRNA in human colon adenocarcinomas. *Int. J. Cancer*. 87, 2000, S. 5-11.
87. **Kim, C., et al.** Down-regulation of drs mRNA in human prostate carcinomas. *Hum. Pathol*. 34(7), July 2003, S. 654-657.
88. **Yamashita, A., Hakura, A. und Inoue, H.** Suppression of anchorage-independent growth of human cancer cell lines by the drs gene. *Oncogene*. 18, 1999, S. 4777-4787.
89. **Tambe, Y., et al.** A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene. *Oncogene*. 23, 2004, S. 2977-2987.
90. **Kawai, T., et al.** Isolation of a novel mouse variant of the drs tumor suppressor gene. *Cancer Lett*. 183(1), September 2002, S. 79-86.

91. **Okada, T., et al.** URB is abundantly expressed in adipose tissue and dysregulated in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 367, 2008, S. 370-376.
92. **Liu, Y., et al.** URB expression in human bone marrow stromal cells and during mouse development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* . 322, 2004, S. 497-507.
93. **Cha, S., et al.** URB expression in human dermal papilla cells. *Journal of Dermatological Science*. 39, 2005, S. 128-130.
94. **Visconti, R., et al.** Cloning and molecular characterization of a novel gene strongly induced by the adenovirus E1A gene in rat thyroid cells. *Oncogene*. 22, 2003, S. 1087-1097.
95. **Tremblay, F., et al.** Bidirectional Modulation of Adipogenesis by the Secreted Protein CCDC80/DRO1/URB . *The Journal of Biological Chemistry*. January 2009.
96. **Mülhardt, C.** *Der Experimentator. Molekularbiologie/ Genomics*. [Hrsg.] G. Fischer. 3. Auflage. Berlin/ Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2002. S. 79, 120.
97. **Invitrogen.** User Manual. TOPO TA Cloning. 2006.
98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [Online] 2007.
99. **Invitrogen.** User Manual. One Shot TOP10 Competent Cells. 2004.
100. **Schmitz, S.** *Der Experimentator. Zellkultur*. 1. Auflage. s.l. : Spektrum Akademischer Verlag/ Elsevier, 2007. S. 96.
101. **Rehm, H.** *Der Experimentator. Proteinbiochemie/ Proteomics*. 5. Auflage. München : Spektrum Akademischer Verlag/ Elsevier, 2006. S. 5; 12; 27.
102. **Bornkamm, G., et al.** Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Research*. Vol. 3, 2005, Bd. No.16.
103. <http://www.cellsignal.com/products/9746.html>. [Online] 2009.
104. <http://datasheets.scbt.com/sc-6035.pdf>. [Online] 2007.
105. <http://www.cellsignal.com/pdf/2781.pdf>. [Online] 2007.
106. <http://datasheets.scbt.com/sc-5276.pdf>. [Online] 2007.
107. <http://rsweb.nih.gov/ij/>. [Online] 2009.
108. **Marcantonio, D., et al.** Cloning and Characterization of a Novel Gene That is Regulated by Estrogen and Is Associated with Mammary Gland Carcinogenesis . *Endocrinology*. 142, 2001, Bd. 6, S. 2409-2418.