

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur zellulären Seneszenz Cathepsin X-defizienter Zellen

Steffen Kraus

aus

Frankfurt am Main

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. Marianne Jochum und Frau PD Dr. Dorit Nägler betreut und von Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 25.03.2014

.....
(Steffen Kraus)

Dissertation eingereicht am: 25.03.2014

1. Gutachterin / 1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar

2. Gutachterin / 2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Marianne Jochum

Mündliche Prüfung am: 21.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
A Zusammenfassung	1
B Einleitung	3
B.1 Proteasen und ihre pathophysiologischen Funktionen	3
B.1.1 Rolle der Proteasen bei Tumorerkrankungen	3
B.1.2 Allgemeine Aspekte und physiologische Funktionen	4
B.2 Cysteinproteasen	5
B.2.1 Cathepsin X.....	8
B.3 Zelluläre Programme zur Tumorsuppression	10
B.3.1 Apoptose.....	11
B.3.2 Zelluläre Seneszenz.....	12
B.3.2.1 Veränderte Genexpression bei zellulärer Seneszenz	13
B.3.2.2 Vergleich der zellulären Seneszenz in Maus und Mensch.....	14
B.4 Das IGF-System	16
B.4.1 Signaltransduktion über den IGF-I-Rezeptor	17
B.4.2 Zellzyklusregulation durch den IGF-I-Rezeptor.....	18
B.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	20
C Material und Methoden	22
C.1 Material	22
C.1.1 Geräte	22
C.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel	23
C.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	24
C.1.3.1 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Methoden.....	24
C.1.3.1.1 Vektoren.....	24
C.1.3.1.2 Oligonukleotide	25
C.1.3.2 Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken	26
C.1.3.2.1 Zelllinien und primäre Zellen	26
C.1.3.3 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken	27
C.1.3.4 Antikörper und Konjugate.....	27
C.2 Methoden	29
C.2.1 Proteinbiochemische Methoden.....	29
C.2.1.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen.....	29
C.2.1.2 Isolierung des Zellkulturüberstandes	29
C.2.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	30
C.2.1.4 Herstellung von Gelen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30

C.2.1.5 Proteinnachweis mittels Immunoblot-Analyse.....	31
C.2.1.6 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillantblau.....	32
C.2.1.7 Quantitative Bestimmung von Cathepsin X mittels Sandwich-ELISA.....	32
C.2.1.8 Messung der Apoptose über die Caspase 3-Aktivität.....	32
C.2.1.9 Untersuchung der SA- β -Galaktosidase-Aktivität.....	33
C.2.1.10 Messung des Abbaus von EZM-Proteinen durch Cathepsine.....	33
C.2.2 Zellbiologische Methoden	34
C.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	34
C.2.2.2 Kultivierung von Säugetierzellen.....	34
C.2.2.3 Subkultivierung von Säugetierzellen.....	34
C.2.2.4 Zellzahlbestimmung.....	35
C.2.2.5 siRNA-Transfektion von NHDF- und Prostatakarzinom-Zellen	35
C.2.2.6 Plasmid/siRNA-Kotransfektion von NHDF.....	35
C.2.2.7 Bestimmung der Transmigrationsrate	36
C.2.2.7 Epifluoreszenzmikroskopie.....	37
C.2.2.8 Annexin V-Detektion zur Apoptosemessung.....	38
C.2.2.9 Scratch Assay zur Untersuchung der Migration von Fibroblasten.....	38
C.2.2.10 Messung der Zellproliferation.....	39
C.2.2.10.1 Bestimmung der Populationsverdopplungsrate von MEF	39
C.2.2.10.2 CyQUANT-Assay	39
C.2.2.10.3 BrdU ELISA.....	39
C.2.2.11 Zellzyklusanalysen	40
C.2.2.11.1 Verteilung der Zellzyklusphasen einer Kultur	40
C.2.2.11.2 Bestimmung der Zellzyklusgeschwindigkeit	40
C.2.2.12 Markierung von Autophagosomen mittels Promo™ Autophagy Sensors (LC3B-GFP)....	41
C.2.2.12 Markierung saurer Vesikel in NHDF-Zellen.....	41
C.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	42
C.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	42
C.2.3.2 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen.....	42
C.2.3.3 cDNA-Synthese.....	43
C.2.3.4 Quantitative RT-PCR	43
C.2.3.5 Herstellung von Cathepsin X-Expressionsvektoren	43
C.2.3.6 Transformation von <i>E. coli</i>	44
C.2.3.7 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	44
C.2.3.7 Statistische Auswertung	44
D Ergebnisse.....	45
D.1 Cathepsin X-Defizienz in verschiedenen zellulären Systemen.....	45
D.1.1 NHDF als Modellsystem.....	45
D.1.2 MEF als Modellsystem.....	48
D.1.3 Prostatakarzinomzellen PC-3 als Modellsystem	49
D.2 Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die Invasions- und Migrationsfähigkeit von Fibroblasten.....	51
D.2.1 Transmigration Cathepsin X-defizienter Fibroblasten	51
D.2.2 Migration Cathepsin X-defizienter Fibroblasten	52
D.2.3 Degradation von EZM-Substraten durch die Cathepsine B, L und X.....	54
D.3 Beschleunigte Seneszenz durch Cathepsin X-Defizienz.....	55
D.3.1 Morphologie.....	56
D.3.1.1 Phänotyp Cathepsin X-defizienter Fibroblasten	56

D.3.1.2 Zelldurchmesser Cathepsin X-defizienter Fibroblasten	57
D.3.2 Proliferationsverhalten Cathepsin X-defizienter Fibroblasten.....	59
D.3.2.1 Zellzahlbestimmung über den DNA-Gehalt und Populationsverdopplungsrate.....	59
D.3.2.2 Bestimmung der Proliferation von Fibroblasten mittels BrdU-Inkorporation.....	60
D.3.3 Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die Apoptose	61
D.3.3.1 Apoptosemessung in Fibroblasten mittels Annexin V-Markierung.....	62
D.3.3.2 Apoptosemessung über die Caspase 3-Aktivität.....	64
D.3.4 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität in NHDF.....	65
D.3.5 Seneszenz-assoziierte Genexpression in Fibroblasten	66
D.3.6 Zellzyklusanalysen	67
D.3.6.1 Analyse der Zellzyklusverteilung unter Verwendung von Propidiumjodid	67
D.3.6.2 Analyse der Zellzyklusprogression mittels BrdU Pulse-Chase.....	68
D.4. Untersuchungen zum Mechanismus der durch Cathepsin X-Defizienz ausgelösten	
Seneszenz	70
D.4.1 Untersuchung des IGF-Signalwegs	70
D.4.1.1 Nachweis von IGF-IR.....	70
D.4.1.2 Phosphorylierung des IGF-I-Rezeptors	71
D.4.1.3 Subzelluläre Lokalisation des IGF-IR	73
D.4.1.4 Proliferation und Invasion nach Stimulation durch IGF-I und IGF-II.....	74
D.4.2 Einfluss der Cathepsin X-Downregulation auf die Aktivierung des MAPK-Signalwegs.....	75
D.4.3 Autophagiemechanismen bei Cathepsin X-defizienten Fibroblasten.....	77
D.4.3.1 Markierung von Autophagosomen mittels GFP-LC3B.....	77
D.4.3.2 Markierung saurer Vesikel mittels LysoTracker®	78
E Diskussion	80
E.1 Beteiligung von Cathepsinen an invasiven Prozessen.....	80
E.2 Zelluläre Modellsysteme.....	81
E.3 Auswirkungen der Cathepsin X-Defizienz auf die zelluläre Seneszenz	82
E.3.1 Morphologie	82
E.3.2 Proliferation und Zellzyklus	83
E.3.3 Expression Seneszenz-assoziiierter Gene.....	84
E.4 Auswirkungen der Cathepsin X-Defizienz auf den IGF-I-Signalweg	86
E.5 Auswirkungen der Cathepsin X-Defizienz auf die Autophagie.....	92
F Schlussfolgerungen und Ausblick	94
G Literaturverzeichnis.....	96
H Danksagung	112

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen für Einheiten

AU	<i>arbitrary units</i>
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
v/v	Volumenanteil in Prozent
w/v	Gewichtsanteil in Prozent

Abkürzungen für Proteine und andere Moleküle

AFC	7-Amino-4-trifluormethylcumarin
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CDKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat
DAPI	4',6'-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminteraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosomal antigen 1</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	IGF-Bindeprotein
IGF-R	<i>insulin-like growth factor receptor</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Lamp1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LC3B	<i>microtubule-associated protein light chain isoform 3 B</i>

M6P	Mannose-6-Phosphat
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
pRb	Retinoblastoma Protein
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Sonstige in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen

BacMam	<i>insect Baculovirus with a Mammalian promoter</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
KO	(Cathepsin X-)Knockout
MEF	<i>murine embryonic fibroblasts</i>
MMTV-PyMT	<i>mouse mammary tumor virus-polyoma middle T</i>
NHDF	<i>normal human dermal fibroblasts</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
WT	Wildtyp

A Zusammenfassung

Die Cathepsine bilden eine Gruppe innerhalb der Cysteinproteasen, die primär an der allgemeinen Proteindegredation innerhalb der Lysosomen beteiligt ist. Daneben übernehmen sie jedoch auch zusätzliche wichtige und spezifische Funktionen im Extrazellulärraum sowie in weiteren Bereichen innerhalb der Zelle, wo sie an den unterschiedlichsten physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind.

Cathepsin X ist ein bislang nur unzureichend untersuchter Vertreter der lysosomalen Cysteinproteasen. Man findet in verschiedenen Tumorarten eine Überexpression dieser Protease. Über Ursachen und Wirkung dieser erhöhten Cathepsin X-Expression war zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenig bekannt. Hinweise auf eine Beteiligung dieser Protease an Tumorerkrankungen liefern im Tiermodell gewonnene Daten, wonach sich ein Fehlen von Cathepsin X negativ auf die Tumorprogression auswirkt. Weiterhin belegen zahlreiche *in-vitro*-Studien anhand von Transwell-Experimenten eine verminderte Invasion von humanen Tumorzellen unter Cathepsin X-Defizienz. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, diesem Aspekt weiter nachzugehen und aufzuklären, über welche Mechanismen Cathepsin X die für Tumorerkrankungen entscheidenden zellulären Eigenschaften wie Zellproliferation bzw. -invasion beeinflussen kann. Wir stellten die Hypothese auf, dass die gehemmte Invasion Cathepsin X-defizienter Tumorzellen möglicherweise auf Vorgänge zurückzuführen ist, die unter anderem zelluläre Seneszenz induzieren. Zelluläre Seneszenz ist ein Tumorsuppressormechanismus, dessen vorrangige Aufgabe es ist, DNA-geschädigte Zellen in einen Wachstumsstopp zu überführen und somit deren Ausbreitung zu verhindern.

Um zu klären, ob die zuvor beschriebenen pro-kanzerogenen Effekte von Cathepsin X auch auf physiologische Zellen zutreffen und um die zelluläre Seneszenz bei Cathepsin X-Defizienz zu untersuchen, verwendeten wir Fibroblasten zweierlei Ursprungs: neonatale normale humane dermale Fibroblasten (NHDF), deren Cathepsin X-Expression durch einen siRNA-vermittelten *Knockdown* unterdrückt wurde sowie murine embryonale Fibroblasten (MEF) aus Cathepsin X^{-/-}-Mäusen. Zusätzlich analysierten wir Prostatakarzinomzellen (PC-3, LNCaP), die, ebenso wie die humanen Fibroblasten, mit Cathepsin X-siRNAs behandelt wurden.

Die Analysen der Cathepsin X-defizienten Zellen bestätigten unsere Hypothese einer beschleunigten zellulären Seneszenz. Neben der Ausbildung eines abgeflachten Phänotyps und der Zunahme des Zelldurchmessers konnten wir eine erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase nachweisen. Zudem konnte eine verstärkte Expression weiterer für die Seneszenz charakteristische Gene sowie ein partieller Zellzyklusarrest in G₁ gezeigt werden.

Im Rahmen der Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Mechanismen der durch Cathepsin X-Defizienz ausgelösten Seneszenz wurden auch Auswirkungen auf die Autophagie festgestellt. So führte der Verlust der Protease zu verkleinerten LC3B-positiven Autophagosomen und einer

Anreicherung saurer Vesikel innerhalb der Zellen. Insgesamt handelt es sich hierbei jedoch um sehr dezente Unterschiede. Sehr viel deutlichere Differenzen traten dagegen bei der Untersuchung des *insulin-like growth factor* (IGF)-Systems zutage. Ein *Knockdown* von Cathepsin X in Prostatakarzinomzellen wirkte sich wesentlich auf den IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) aus. Während die IGF-IR-Expression zwar erhöht war, ermittelten wir eine starke Verminderung der Rezeptorphosphorylierung als Antwort auf eine Stimulation mit IGF-I. Zudem konnten Immunfluoreszenz-Aufnahmen belegen, dass die in Kontrollzellen deutlich erkennbare Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) durch den IGF-I-Rezeptor in Cathepsin X-defizienten Zellen trotz IGF-I-Zugabe ausblieb. Im Gegensatz dazu ergab eine Stimulation der Zellen mit IGF-II keine markanten Abweichungen zwischen Cathepsin X-siRNA-behandelten Zellen und den Kontrollzellen. Das IGF-System ist ein wesentlicher Regulator des *downstream* gelegenen *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalwegs, bei dem wir ebenfalls eine differentielle Aktivierung nachweisen konnten. So war die Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) stark vermindert. Im Gegenzug war die Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) bei Cathepsin X-defizienten Zellen erhöht.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal einen Hinweis, auf welche Weise Cathepsin X die Tumorprogression begünstigen kann. Wir konnten mit unseren Experimenten zeigen, dass in Cathepsin X-defizienten Zellen eine beschleunigte zelluläre Seneszenz stattfindet. Im Umkehrschluss kann man nun die Hypothese aufstellen, dass Seneszenzmechanismen durch eine Cathepsin X-Überexpression umgangen werden können. Dabei ist es gut denkbar, dass dies nicht ausschließlich auf Cathepsin X zutrifft, sondern auch auf weitere Cathepsin-Vertreter, die ebenfalls in großen Mengen von Tumoren exprimiert werden. Mögliche Kandidaten sind beispielsweise Cathepsin B oder Cathepsin L. Dieses Wissen ist im Hinblick auf neue Therapieansätze höchst interessant, da die zelluläre Seneszenz als möglicher Angriffspunkt zur Tumorbekämpfung zunehmende Beachtung erfährt.

B Einleitung

B.1 Proteasen und ihre pathophysiologischen Funktionen

B.1.1 Rolle der Proteasen bei Tumorerkrankungen

Bei der Entwicklung effektiver Krebstherapien stellt die Metastasierung von Tumorzellen noch immer das am schwierigsten zu bewältigende Problem dar. Die Malignität eines Tumors hängt zwar auch von seiner Zellteilungsrate ab, der wichtigste Faktor ist jedoch, wie leicht sich Tumorzellen vom Primärtumor ablösen und Metastasen bilden können. Es gilt als allgemein anerkannt, dass die Mehrheit der Patienten nicht am Primärtumor verstirbt, sondern an den Auswirkungen der Metastasierung. Den Proteasen kommt in diesem Szenario eine wichtige Rolle zu, da diese für viele Schritte der Invasion von essentieller Bedeutung sind (Edwards and Murphy, 1998). Zunächst erfüllen die Proteasen dabei die Aufgabe, Zell-Zell-Kontakte zu lösen, wie beispielsweise durch die Spaltung von E-Cadherin, damit einzelne Zellen sich aus dem Zellverband des Tumors lösen und wandern können. Zusätzlich wird die Invasion durch den Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), wie etwa Kollagene, Laminine, Vitronektin oder Fibronektin, gefördert. Dies ist notwendig, damit sich die Zellen innerhalb des Gewebes fortbewegen können. Um Zugang zur Zirkulation zu erhalten, ist es für die Krebszellen erforderlich, die Basallamina, eine spezielle Schicht der EZM, abzubauen und in ein Blut- oder Lymphgefäß einzudringen. Selbstverständlich ist auch bei diesen Prozessen der proteolytische Abbau von entscheidender Bedeutung. Und auch beim letzten Schritt der Metastasierung, dem Austritt der Tumorzellen aus der Zirkulation und der Wanderung im Zielgewebe, helfen Proteasen durch Spaltung von EZM-Komponenten.

Somit ist es von großer Relevanz, die an diesen Prozessen beteiligten Proteasen und Mechanismen genau zu kennen, um Therapieansätze für eine effektive Tumorbekämpfung zu entwickeln. Man weiß inzwischen, dass an der Metastasierung die verschiedensten Vertreter aus den Gruppen der Matrix-Metalloproteasen (MMPs), der Serinproteasen und der Cystein-Cathepsine beteiligt sind (Basbaum and Werb, 1996; Artym et al., 2006; Sloane et al., 2006b). Das genaue Zusammenspiel und die jeweilige Bedeutung einzelner Proteasen bei diesen Vorgängen ist bisher allerdings noch zu großen Teilen ungeklärt und somit Gegenstand der aktuellen Forschung.

B.1.2 Allgemeine Aspekte und physiologische Funktionen

Die Proteasen (auch: Proteinasen oder Peptidasen) bilden eine große Gruppe von Enzymen, deren grundsätzliche Funktion in der Katalyse der Spaltung von Amid-Bindungen in Proteinen oder Peptiden besteht. Sie gehören zur Klasse der Hydrolasen und sind demnach Enzyme, die die hydrolytische Spaltung einer Verbindung unter Verbrauch von Wasser katalysieren. Hinsichtlich ihrer Strukturen herrscht bei den Proteasen eine außerordentlich große Diversität. So findet man unter ihnen sowohl kleine Monomere mit einer minimalen Domänenorganisation als auch riesige, multimere Proteinkomplexe, wie beispielsweise das Proteasom (Bertenshaw et al., 2003; Bedford et al., 2010). Eine ähnlich große Vielfalt herrscht bei den verschiedenen biologischen Prozessen, an denen Proteasen beteiligt sind. Neben dem einfachen, unspezifischen Abbau von Proteinen wirken Proteasen als Prozessierungsenzyme, die hochspezifisch und streng reguliert bestimmte Substrate spalten und diese so irreversibel auf posttranslationaler Ebene modifizieren. Dadurch können Eigenschaften des Substrats wie Lokalisation, Aktivität oder Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst werden (Nishimura et al., 1989; Mortier et al., 2011; Mortier et al., 2012). Dies macht Proteasen zu unverzichtbaren Werkzeugen bei Vorgängen wie DNA-Replikation und -Transkription, Zellproliferation und -migration, Zelldifferenzierung, Ovulation und Befruchtung, Blutgerinnung, Wundheilung, Immunität, sowie Seneszenz und Apoptose, um nur einige Beispiele zu nennen. Dementsprechend führen Störungen im hochkomplexen Netzwerk der Proteasen auch zu den unterschiedlichsten pathologischen Entwicklungen wie z.B. Krebs, Arthritis, Osteoporose oder neurodegenerativen Erkrankungen. Neben diesen intrinsischen Faktoren finden sich auch uni- und multizelluläre Parasiten wie Viren, Bakterien oder Pilze, die eigene Proteasen oder Protease-Inhibitoren nutzen, um sich in den Wirtsorganismus einzuschleusen und dort zu überleben sowie sich zu vermehren (Haldar et al., 2006; McKerrow et al., 2006; Donnelly et al., 2011).

Um ihre vielfältigen und für den Organismus essentiellen Aufgaben erfüllen zu können, bedarf es einer exakten Regulation der Proteaseaktivität, um eine unkontrollierte Spaltung von Substraten zu verhindern. Diese Kontrolle findet auf mehreren Ebenen statt. Die einfachste Art der Regulation besteht in der Modulation der Transkription auf mRNA-Ebene (Overall and Lopez-Otin, 2002). Auf Protein-Ebene findet man häufig inaktive Vorstufen, sogenannte Zymogene, welche erst durch Abspaltung einer inhibierenden Proteindomäne aktiviert werden. Dieser Vorgang kann sowohl autokatalytisch ablaufen als auch von weiteren Proteasen durchgeführt werden (Turk et al., 2012). Weiterhin kann die Proteaseaktivität durch Kofaktoren reguliert werden, die reversibel an die Protease binden und so Einfluss auf deren Aktivität nehmen. Ein sehr bekanntes Beispiel hierfür ist Faktor VIIa der Blutgerinnungskaskade (Vadivel and Bajaj, 2012). Die Aktivität dieser Serinprotease wird entscheidend durch Bindung an das Oberflächen-Glykoprotein Faktor III reguliert. Zusätzlich erfolgt die Regulation der Aktivität über die in jeder Zelle vorhandenen Protease-Inhibitoren (Bode and Huber, 2000). Interessanterweise findet man in Wirbeltieren deutlich weniger unterschiedliche endogene Inhibitoren als Proteasen (Puente and Lopez-Otin, 2004). Die Ursache für dieses Phänomen ist dem Umstand geschuldet, dass die

meisten Inhibitoren eine eher niedrige Spezifität besitzen und daher auf mehrere Ziel-Proteasen gleichzeitig wirken können.

Eine einfache Unterteilung der Proteasen erfolgt aufgrund ihrer bevorzugten Spaltungsstellen. So unterscheidet man zwischen Endopeptidasen, welche innerhalb der Proteinsequenz des Substrats schneiden, und Exopeptidasen, welche an einem der beiden Enden des Substrats schneiden. Letztgenannte werden weiter untergliedert in Amino- und Carboxypeptidasen. Je nachdem, wie viele Aminosäuren an den Enden abgespalten werden, spricht man von Mono-, Di-, oder Triaminopeptidasen bzw. von Monopeptidyl- oder Dipeptidyl-Carboxypeptidasen. Aufgrund der überwältigenden Vielfalt der Proteasen ist diese Einteilung alleine allerdings sehr rudimentär und unzulänglich. Entsprechend ihres Reaktionstyps werden die Proteasen deshalb in die Hauptgruppen Aspartat- (A), Cystein- (C), Glutamat- (G), Metallo- (M), Serin- (S), Threonin- (T) und noch nicht klassifizierte (U) Proteasen eingeordnet, wobei Glutamatproteasen als einzige bisher nicht in Säugetieren gefunden wurden. Diese Hauptgruppen sind aufgrund ihrer Struktur in Clans, und diese wiederum, basierend auf ihren Aminosäuresequenzen, in Familien untergliedert.

Da es sich beim Hauptgegenstand dieser Arbeit, Cathepsin X, um eine lysosomale Cysteinprotease handelt, wird im Folgenden diese Hauptgruppe näher beschrieben.

B.2 Cysteinproteasen

Bei Cysteinproteasen besteht das aktive Zentrum aus einem Cystein, welches über eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem benachbarten Histidin verknüpft ist (Vernet et al., 1995). Die Thiolgruppe des Cysteins wird als Nukleophil bei der katalytischen Spaltung verwendet, das Histidin sorgt für die notwendige Deprotonierung des Cystein-Thiols, weshalb man hier auch von einer katalytischen Dyade spricht. Zusätzlich sind bei vielen Vertretern der Cysteinproteasen noch zwei weitere Aminosäuren an der Katalyse beteiligt. So ist ein der katalytischen Dyade vorstehendes Glutamin für die Bildung der sog. „Oxyanion-Bindungsstelle“ zuständig. Zudem hilft häufig ein Asparagin bei der korrekten Orientierung des Imidazolringes des Histidins.

Nach Einteilung der MEROPS-Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>) (Rawlings, 2013) bestehen die Cysteinproteasen aus 58 Familien, die aufgrund ähnlicher Tertiärstrukturen unterschiedlichen Clans zuzuordnen sind. Der Clan CA besteht aus 27 Familien und bildet somit den größten Clan innerhalb der Cysteinproteasen. Die Papain-Familie innerhalb dieses Clans wird mit C1 bezeichnet und untergliedert sich in 2 Subfamilien: Die Subfamilie C1B umfasst die Bleomycin-Hydrolasen, während C1A für die Papain-Familie steht. Auch die lysosomalen Cystein-abhängigen Cathepsine sind der Familie C1A zugeordnet.

Der Name Cathepsin wurde von Willstätter und Bamann in den 1920er Jahren eingeführt (Willstätter and Bamann, 1929) und ist von dem griechischen Wort „καθελειν“ für „verdauen“ abgeleitet. Diese Namensgebung war zunächst unabhängig von der Enzymklasse, weshalb neben Cysteinproteasen auch einige Serin- (Cathepsine A und G) und Aspartat-Proteasen (Cathepsine D und E) als Cathepsine bezeichnet wurden. Diese sollen hier jedoch nicht weiter behandelt werden, weshalb im Folgenden der Begriff „Cathepsin“ ausschließlich für lysosomale Thiol-abhängige Cathepsine verwendet wird. Im Menschen kommen 11 Vertreter der Cystein-Cathepsine (Cathepsin B, C, F, H, L, K, O, S, V, W und X) vor, denen neben dem lysosomalen Proteinabbau etliche weitere (patho-)physiologische Funktionen zugeschrieben werden.

Die Cathepsine B, H und L werden beispielsweise in Lysosomen exprimiert und sind in praktisch allen Zelltypen zu finden, wo sie im Wesentlichen *housekeeping*-Funktionen zu übernehmen scheinen und essentiell für den Proteinumsatz sind. Etwa 40 % der zellulären Proteindegradation kann mit unspezifischen Cathepsin-Inhibitoren unterdrückt werden (Shaw and Dean, 1980). Desweiteren ist die Expression dieser Cathepsine, insbesondere der Cathepsine B und L, in Tumoren häufig erhöht, verbunden mit einer verstärkten Sekretion in den extrazellulären Raum. Die Enzyme werden meist als Proformen sezerniert, welche später dann autokatalytisch oder mit Hilfe anderer Proteasen aktiviert werden können. Andererseits können auch bereits aktivierte Cathepsine von Tumorzellen und Makrophagen sezerniert werden (Mohamed and Sloane, 2006). In diesem Zusammenhang unterstützen die genannten Proteasen Migrations- und Invasionsprozesse der Tumorzellen zum Teil über Spaltung der extrazellulären Matrix (EZM) sowie über weitere bisher noch nicht näher aufgeklärte Mechanismen.

Andere Mitglieder der Cathepsin-Familie weisen dagegen eine limitierte Gewebeexpression auf. Beispielsweise wird Cathepsin K hauptsächlich in Osteoklasten exprimiert, wo es wichtige Aufgaben beim Knochenabbau übernimmt (Inaoka et al., 1995; Bromme et al., 1996). So bilden Cathepsin K-defiziente Mäuse eine Osteopetrose aus (Saftig et al., 1998), die der Pyknodysostose ähnelt. Diese menschliche Erbkrankheit beruht auf Mutationen im Cathepsin K-Gen und manifestiert sich in einem veränderten Knochenaufbau (Gelb et al., 1996). Andererseits führt eine verstärkte Cathepsin K-Aktivität u.a. zu Osteoporose, weshalb Cathepsin K-Inhibitoren bei dieser Indikation zukünftig einen interessanten Therapieansatz liefern könnten (Deaton and Kumar, 2004; Stoch et al., 2012).

Einige Cathepsine spielen auch für das Immunsystem eine wesentliche Rolle. So sind mehrere Cathepsine an der Bildung und dem Transport der *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-II-Moleküle beteiligt. Die wichtigste an diesen Prozessen involvierte Cysteinprotease ist Cathepsin S, welches die invariante Kette Ii zu *class II-associated invariant chain peptide* (CLIP) prozessiert (Nakagawa et al., 1999; Shi et al., 1999). Cathepsin V, das größtenteils im Thymus exprimiert wird, scheint ebenfalls an diesem Prozess mitzuwirken (Bromme et al., 1999; Tolosa et al., 2003). In der Maus fehlt Cathepsin V, jedoch stellt das murine Cathepsin L ein Cathepsin V-Homolog dar (Nakagawa et al., 1998; Hagemann et al., 2004). An der Prozessierung der

invarianten Kette sind also mehrere Cathepsine beteiligt, jedoch scheint deren jeweilige Funktion auf bestimmte Zell- und Gewebetypen beschränkt zu sein. Cathepsin C ist ebenfalls an der Immunabwehr beteiligt, indem es die Serinproteasen Granzym A und B sowie die neutrophile Elastase und Cathepsin G aktiviert. In Cathepsin C-Knockout-Mäusen führt dies zu Defekten bei der durch cytotoxische T-Zellen hervorgerufenen Apoptose (Pham and Ley, 1999). Mutationen, die das Cathepsin C-Gen betreffen, können je nach deren allelischer Variante das Papillon-Levèvre-Syndrom oder aber das Haim-Munk-Syndrom auslösen, die sich beide in ihrer Symptomatik ähneln und im Wesentlichen durch eine schwerwiegende Periodontitis gekennzeichnet sind (Hart et al., 2000).

Neben ihren Funktionen in physiologischen Prozessen stehen einige Cathepsine auch im Zusammenhang mit Krebs und Tumorprogression. Häufig findet man bei Tumoren eine erhöhte Expression, Aktivität oder Fehl-Lokalisation verschiedener Cathepsine, was meist auch mit einer schlechten Prognose korreliert (Lah et al., 2000; Scorilas et al., 2002; Berdowska, 2004). So kann eine erhöhte Cathepsin B-Aktivität als negativer prognostischer Marker für Tumoren der Brust, Lunge, Eierstöcke oder des Gehirns dienen (Jedezsko and Sloane, 2004). Gleiches gilt für Cathepsin L bei Patienten, die an kolorektalen Tumoren bzw. Brust-, Kopf-, oder Nackentumoren leiden. Eine erhöhte Cathepsin L-Aktivität geht hier meist mit einer verringerten Überlebensrate einher (Berdowska, 2004). Weiterhin werden die beiden Cathepsine B und L in Tumoren des Pankreas mit zunehmender Malignität der Tumorzellen verstärkt heraufreguliert (Gocheva et al., 2006; Sulpizio et al., 2012). Vor allem erhöhte Cathepsin B-Mengen wurden dabei insbesondere im Bereich der Zellen der Invasionsfront nachgewiesen, was für eine direkte Beteiligung dieser Protease an der Metastasierung spricht. Diese und ähnliche Erkenntnisse führten zu weiteren Studien, in denen der Zusammenhang zwischen einzelnen Cathepsinen und der Metastasierung in *in-vitro*-Experimenten untersucht wurde. Die Downregulation mittels RNAi sowie eine Inhibition der Aktivität von Cathepsin B führten in verschiedenen Krebszelllinien zu verminderter Motilität sowie Invasion in Matrigel-Assays (Krueger et al., 1999; Szpaderska and Frankfater, 2001), wohingegen eine Überexpression in einer nur schwach metastasierenden Melanomzelllinie in einer gesteigerten Invasionsfähigkeit resultierte (Szpaderska and Frankfater, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Cathepsin L veröffentlicht (Levicar et al., 2003; Rousselet et al., 2004). Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Cystein-Cathepsine konnten *in-vivo* unter Verwendung der *Knockout*-Technologie gefunden werden. Im Rip1-Tag2 Tumormodell zeigten *Knockouts* einzelner Cathepsine, dass Cathepsin B an Tumorbildung, Tumorwachstum und der Invasion von Tumorzellen beteiligt ist, Cathepsin S an Tumorbildung und Invasion, und Cathepsin L an Tumorwachstum und Invasion (Gocheva et al., 2006; Wang et al., 2006). Cathepsin B-Defizienz verzögerte im *mouse mammary tumor virus-polyoma middle T* (MMTV-PyMT) Brustkrebs-Modell außerdem die Tumorentstehung und führte sowohl zu kleineren Primärtumoren als auch zu reduzierter Größe der Lungenmetastasen (Vasiljeva et al., 2006). Dieses Modell weist zudem auf eine gewisse funktionelle Redundanz innerhalb der Cathepsine hin, da hier eine kompensatorische Heraufregulation von Cathepsin X in den Cathepsin B-defizienten Tumorzellen festgestellt wurde.

Eine Möglichkeit, wie Cathepsine die Tumordinvasion unterstützen können, ist der direkte Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) über proteolytische Spaltung. Andererseits kann auch ein indirekter Einfluss auf die EZM-Degradation stattfinden, indem beispielsweise die Cathepsine B und L den Pro-Urokinasentyp-Plasminogen-Aktivator (Pro-uPA) zu uPA prozessieren (Goretzki et al., 1992; Guo et al., 2002). uPA und sein Rezeptor uPAR stellen potente Effektoren beim Abbau von EZM dar, da durch uPA/uPAR die Serinprotease-Vorstufe Plasminogen in Plasmin umgewandelt wird. Plasmin kann einerseits direkt zum Abbau von EZM-Komponenten beitragen, andererseits konvertiert Plasmin verschiedene Matrixmetalloproteasen (MMPs) (Eeckhout and Vaes, 1977) in ihre aktive Form, die ihrerseits EZM-abbauende Eigenschaften besitzen.

Neben den „etablierten“ Cathepsinen B und L wurde in weiteren Studien auch eine erhöhte Expression von Cathepsin X in Tumoren, insbesondere bei Prostata- und Magenkarzinomen, gefunden (Nägler et al., 2004; Krueger et al., 2005). Jedoch war die Bedeutung dieser Protease für die Tumorentstehung oder -progression zu Beginn dieser Arbeit noch völlig unklar.

B.2.1 Cathepsin X

Humanes Cathepsin X wurde erstmals 1998 fast zeitgleich von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen entdeckt und beschrieben (Nägler and Menard, 1998; Santamaria et al., 1998). Dabei führten Santamaria et al. den Namen Cathepsin Z ein, während Nägler und Menard dagegen den Namen Cathepsin X verwendeten, entsprechend einer Publikation aus dem Jahre 1985, in der das bovine Ortholog in einer cDNA-Bibliothek aus Rinderherz identifiziert wurde. Die bis dahin unentdeckte Cysteinprotease wurde damals Cathepsin X genannt (Gay and Walker, 1985).

Strukturell weist Cathepsin X innerhalb der Cathepsinfamilie einige Besonderheiten auf. Die Proregion ist mit nur 38 Aminosäuren die kürzeste aller Cathepsine, während sie bei anderen Cathepsinen von 62 Resten bei Cathepsin B bis zu 251 Resten bei Cathepsin F reicht. Außerdem besitzt die Proregion von Cathepsin X keine Sequenzhomologie zu den Proregionen anderer Cysteinproteasen, zudem bildet sie als einzige Cathepsin-Proregion keine Sekundärstrukturen aus (Sivaraman et al., 2000; Nägler and Menard, 2003). Wie bei den übrigen Vertretern der Familie, besitzt die Proregion eine Inhibitorfunktion für das Enzym. Dabei wird über ein Cystein (Cys10p) eine Disulfidbindung mit dem Cystein des aktiven Zentrums (Cys31) ausgebildet. Dies macht Procathepsin X zu dem einzigen bekannten Zymogen, bei dem die Inhibition durch das Propeptid über eine reversible kovalente Bindung mit dem aktiven Cystein erfolgt (Sivaraman et al., 2000). Ein weiteres Charakteristikum von Procathepsin X ist das Vorhandensein eines RGD-Motivs (Arg-Gly-Asp) innerhalb der Proregion, das sich an einer exponierten Stelle des Moleküls befindet und die Bindung an Integrine ermöglicht (Lechner et al., 2006).

Auch das gereifte Enzym ist im Vergleich zu den anderen Cathepsinen durch mehrere Besonderheiten gekennzeichnet. So existiert eine Insertion von drei Aminosäuren in einer hochkonservierten Region zwischen Gln22 der Oxyanion-Bindungsstelle und dem aktiven Cystein, Cys31, was sehr ungewöhnlich für papainähnliche Cysteinproteasen ist. Diese drei Aminosäuren bilden mit zwei weiteren den sogenannten *mini-loop* (Nägler et al., 1999). In dieser strukturellen Eigenart scheint die Hauptursache für die strikte Carboxypeptidaseaktivität von Cathepsin X zu liegen. Neben der RGD-Sequenz im Propeptid enthält auch das gereifte Enzym ein Integrin-Erkennungsmotiv mit der Sequenz Glu-Cys-Asp (ECD), worüber eine Interaktion mit β_2 -Integrinen stattfinden kann (Obermajer et al., 2006).

Wie bereits erwähnt wurde, handelt es sich bei Cathepsin X um eine Carboxypeptidase, genauer gesagt um eine Mono-peptidyl-Carboxypeptidase (Nägler et al., 1999). Verantwortlich hierfür ist der oben angesprochene *mini-loop*, der die S2'-Position bedeckt und das C-terminale Carboxylat des Substrats mit His23 und Tyr27 in der P1'-Position verankert (Devanathan et al., 2005). Diese Mono-peptidyl-Carboxypeptidaseaktivität von Cathepsin X ist einzigartig unter den humanen Cathepsinen und ist auch Ursache für die fehlende Möglichkeit der autokatalytischen Aktivierung dieses Enzyms, im Gegensatz zu den meisten anderen Cysteinproteasen der Papain-Familie. *In vitro* kann das Zymogen nur durch Zugabe kleiner Mengen endoproteolytischer Enzyme, etwa Cathepsin L, in seine gereifte Form überführt werden (Nägler et al., 1999).

Über die spezifischen Funktionen von Cathepsin X ist bislang nicht viel bekannt. Neben seinen Aufgaben im allgemeinen lysosomalen Proteinabbau fanden sich jedoch schon früh Hinweise auf mögliche zusätzliche Funktionen dieser Protease, in erster Linie im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen. Beispielsweise weisen antigenpräsentierende Monozyten/Makrophagen hohe Mengen Cathepsin X auf (Journet et al., 2000; Garin et al., 2001), ebenso wie dendritische Zellen (Stichel and Luebbert, 2007). Weitere Hinweise auf eine Verbindung zwischen Cathepsin X und Inflammation liefern zwei Studien, in denen erhöhte Werte für Cathepsin X in Plasmaproben von Patienten mit multiplen Traumata (Nägler et al., 2006) bzw. in der Magenschleimhaut von Patienten mit *H. pylori*-induzierter Gastritis (Krueger et al., 2005) nachgewiesen wurden. Daneben zeigt eine Studie im Mausmodell eine Korrelation zwischen der Cathepsin X-Expression im Gehirn und dem Altern (Wendt et al., 2007). Diese Daten dokumentieren einen altersabhängigen Anstieg der Expression von Cathepsin X und eine Heraufregulation in Gliazellen innerhalb degenerativer Gehirnbereiche des Mausehirns.

Cathepsin X scheint also bei verschiedenen pathologischen Vorgängen beteiligt zu sein. Insbesondere die erhöhte Expression und Sekretion von Procathepsin X in einigen Tumorarten macht es zu einem interessanten Studienobjekt. So wurden in Prostata Tumoren erhöhte Mengen des Cathepsin X-Proteins im Vergleich zu gesundem Drüsengewebe nachgewiesen (Nägler et al., 2004). Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde die Serumkonzentration von Cathepsin X bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass erhöhte Cathepsin X-Werte mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf einhergingen (Vizin et al., 2012). Auch in Magen-Biopsien war Cathepsin X in den untersuchten Tumoren signifikant heraufreguliert (Krueger et al., 2005). Speziell bei der

letzten Studie war zusätzlich auffällig, dass die höchste Cathepsin X-Expression im Bereich der Invasionsfront auftrat, während in den zentralen Bereichen der Tumoren nur sehr geringe Mengen der Protease vorhanden waren. Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss dieser Protease auf das Invasions-/Migrationsverhalten hin. *In-vitro*-Studien mit Transwell-Kammern zeigten eine reduzierte Invasion von Magenkrebs-Zellen, deren Cathepsin X-Produktion durch Antisense-Oligonukleotide inhibiert wurde (Krueger et al., 2005). Über welche Wege dies jedoch abläuft, ist bislang nicht geklärt. Eine nennenswerte Beteiligung von Cathepsin X am Abbau von extrazellulärer Matrix (EZM) kann dabei praktisch ausgeschlossen werden. Da es sich hier um eine Carboxypeptidase handelt, die nur einzelne Aminosäuren vom C-Terminus eines Substrats abspalten kann, ist nicht davon auszugehen, dass Cathepsin X einen großen Anteil an der Degradation der EZM-Komponenten haben kann. Es ist jedoch bekannt, dass Cathepsin X mit verschiedenen an Signaltransduktionsprozessen beteiligten Molekülen interagieren kann, was die Möglichkeit einer Beeinflussung der Invasionsmechanismen auf diesem Wege nahe legt. Hierbei könnten beispielsweise das RGD- und das ECD-Motiv von (Pro-)Cathepsin X zur Bindung an Integrine beitragen, aber auch Heparansulfat-Proteoglykane stellen eine mögliche Bindungsstelle für Cathepsin X dar (Nascimento et al., 2005). Welche zellulären Antworten durch derartige Interaktionen im Detail hervorgerufen werden, ist zur Zeit noch weitgehend unklar, jedoch stehen sowohl Integrine als auch Heparansulfat-Proteoglykane im Zusammenhang mit vielen zellulären Prozessen wie Wachstum/Proliferation, Zelladhäsion, Angiogenese und anderen für Tumoren wichtige Funktionen.

B.3 Zelluläre Programme zur Tumorsuppression

Der Schutz der Stabilität und Integrität des Genoms ist eine wesentliche Voraussetzung, um der Tumorigenese entgegenzuwirken. Zu diesem Zweck entwickelten sich in eukaryotischen Organismen komplexe Systeme, um DNA-Schäden aufzuspüren und zu reparieren. In Abhängigkeit vom Schweregrad der Schädigung, können Zellen unterschiedlich darauf reagieren: Bei leichten Defekten tritt die Zelle in einen reversiblen Zellzyklusarrest ein, bis die DNA-Reparaturmechanismen vollständig abgelaufen und die Schäden behoben sind. Anschließend kann die Zelle wieder in den normalen Zellzyklus eintreten. Gelingt dies nicht, antwortet die Zelle entweder mit Apoptose oder mit zellulärer Seneszenz. Diese beiden Notfallprogramme verfolgen letztlich das gleiche Ziel: Die Unterdrückung der Proliferation von Zellen, bei denen die Gefahr einer onkogenen Transformation besteht. Dennoch wirken beide Prozesse völlig unterschiedlich. Während die betroffenen Zellen durch Apoptose eliminiert werden und absterben, sorgt die Seneszenz für einen permanenten, irreversiblen Wachstumsstopp. Dabei bleiben die Zellen über einen langen Zeitraum vital und metabolisch aktiv, können jedoch die erworbenen Schäden nicht mehr an die Tochtergeneration weitergeben.

Beiden Vorgängen, Apoptose und Seneszenz, liegen hochkomplexe Programme zugrunde, wobei die Abläufe bei der Apoptose bisher sehr viel gründlicher untersucht wurden als die Seneszenz.

B.3.1 Apoptose

Die Apoptose ist die häufigste Form des programmierten Zelltods und ein unentbehrlicher Mechanismus für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Über die Apoptose werden beispielsweise Größe und Form einzelner Gewebesysteme während der unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Ontogenese reguliert oder die Zahl bestimmter Immun-Effektorzellen nach einer überstandenen Infektion reduziert (Los et al., 1999). Auch aufgrund von DNA-Schäden begehen Zellen Apoptose, um den Organismus vor Folgeschäden wie etwa Tumoren zu schützen (Mondello and Scovassi, 2010).

Apoptotische Zellen durchlaufen eine Reihe charakteristischer morphologischer Veränderungen (Majno and Joris, 1995). Zunächst kommt es zu einer Kondensation des Nukleus sowie des Cytoplasmas. In der zweiten Phase bildet die Plasmamembran kleine Bläschen aus, was in der Folge zur Freisetzung kleiner, membranumschlossener Partikel mit cytoplasmatischem Inhalt, sogenannte *apoptotic bodies*, führt. Diese *apoptotic bodies* können schließlich von benachbarten Zellen phagozytiert werden, ohne dass Entzündungsreaktionen oder eine Vernarbung des Gewebes stattfinden (Wickman et al., 2012).

Apoptose ist abhängig von der Aktivierung einer Gruppe von Cysteinproteasen, den Caspasen. Diese spalten eine Reihe von zellulären Substraten, wodurch letztendlich die charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle ausgelöst werden. Alle Caspasen sind zunächst als inaktive Proformen in der Zelle vorhanden. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung der Pro-Domäne, in der Regel durch andere Caspasen. Bei der Apoptose unterscheidet man den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg. Bei der extrinsischen Form binden extrazelluläre Liganden an spezifische Rezeptoren der Zelle, die unter dem Begriff *death receptors* zusammengefasst werden. Die Ligandenbindung führt bei den Rezeptoren zu Konformationsänderungen und zur Bildung des *death initiation signaling complex* (DISC), einem Multiproteinkomplex, der zur Aktivierung von Caspase 8 und somit zur Initiierung der Caspasekaskade führt. Die aktivierte Caspase 8 aktiviert nun weitere Caspase 8-Moleküle sowie *Downstream-Caspasen*, wie etwa Caspase 3, welche die wichtigste Effektorcaspase darstellt (Lavrik and Krammer, 2012). Die intrinsische Apoptose wird dagegen von einer Reihe von Stressfaktoren ausgelöst, wozu etwa DNA-Schädigungen oder oxidativer Stress zählen, und ist abhängig von mitochondrialen pro-apoptotischen Faktoren. Dabei wird zunächst die Mitochondrienmembran permeabel, wodurch Cytochrom C im Cytosol freigesetzt wird. Dort bindet es zusammen mit (d)ATP an den *apoptotic protease activating factor* (Apaf1) (Elmore, 2007). Dieser Apoptosom genannte Komplex aktiviert schließlich Caspase 9, welche wiederum weitere *downstream* gelegene Elemente der Caspasekaskade aktiviert.

B.3.2 Zelluläre Seneszenz

Unter dem Begriff „zelluläre Seneszenz“ oder auch „replikative Seneszenz“ versteht man einen Tumorsuppressormechanismus zum Schutz des Organismus vor entarteten Zellen. Ähnlich der Apoptose, liegt auch dem Mechanismus der Seneszenz ein genetisches Programm zugrunde. Bereits in den 1960er Jahren beobachtete Leonard Hayflick, dass primäre Fibroblastenkulturen *in vitro* nach einer bestimmten Anzahl von Zellverdopplungen das Wachstum einstellen (Hayflick and Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Derartige Zellen bleiben über Wochen lebensfähig, können sich jedoch trotz ausreichender Mengen an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sowie genügend Raum nicht weiter teilen. Diese natürliche Grenze des Proliferationspotentials wird seitdem auch als *Hayflick limit* bezeichnet und tritt bei humanen Fibroblasten nach etwa 50 bis 100 Verdopplungszyklen ein. Inzwischen ist bekannt, dass die Ursache für dieses Phänomen in vielen Zelllinien die fortschreitende Verkürzung der Telomere ist. Daneben kann Seneszenz auch durch viele andere Arten von (irreparablen) DNA-Schäden, wie beispielsweise onkogene Mutationen, ausgelöst werden. Dadurch werden *DNA damage response* (DDR)-Mechanismen aktiviert (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004), was schließlich zu einem Zellzyklusarrest führt, um der Zelle ausreichend Zeit für die Reparatur der Schäden zur Verfügung zu stellen. Gelingt dies, werden die DDR-Signalwege abgeschwächt und die Zelle tritt wieder in den Zellzyklus ein. Bei schwerwiegenderen Schäden, deren Reparatur nicht oder nur ungenügend gelingt, bildet sich ein irreversibler Arrest aus. Diese seneszenten Zellen enthalten meist einen der G₁-Phase entsprechenden DNA-Gehalt und sind, trotz des Wachstumsstopps, weiterhin metabolisch aktiv (Di Leonardo et al., 1994; Herbig et al., 2004). Es finden sich daneben jedoch auch Berichte über seneszente Zellen mit einem DNA-Gehalt der G₂- oder S-Phase (Zhu et al., 1998; Olsen et al., 2002; Di Micco et al., 2006; Yin et al., 2011). Interessanterweise können auch Tumorzellen, welche in Kultur für gewöhnlich unbegrenzt proliferieren, die Fähigkeit behalten, Seneszenz auszubilden (Shay and Roninson, 2004).

Neben dem Wachstumsstopp ist ein weiteres Charakteristikum seneszenten Zellen ihre Fähigkeit, weitreichende morphologische Transformationen zu durchlaufen. Besonders deutlich wird dies beispielsweise bei Fibroblasten, die im Normalzustand eine sehr schlanke, spindelförmige Gestalt aufweisen, wohingegen seneszente Fibroblasten von einer abgeflachten und stark verbreiterten Morphologie sowie einem vergrößerten Zellvolumen gekennzeichnet sind (Robbins et al., 1970b). Dem zugrunde liegen umfassende Veränderungen des Cytoskelllets. So sind die Cytoskelettbestandteile Aktin und Vimentin in seneszenten Zellen deutlich zu Faserbündeln angeordnet, ganz im Gegensatz etwa zu quieszenten Zellen (die sich in der G₀-Phase befinden). Ein entscheidender Faktor bei der Bildung dieser sogenannten Seneszenz-assoziierten *actin stress fibers* scheint Caveolin-1 zu sein, da eine Downregulation dieses Membranproteins zum Verlust der *stress fibers* und der Seneszenz-charakteristischen Morphologie führt. Weiterhin weisen seneszente Zellen ein Cytoplasma mit erhöhtem Vakuolengehalt und ein vergrößertes Lysosomenvolumen auf (Kurz et al., 2000). Häufig kommt es auch zu einer zentralen Lokalisation des Nukleus sowie zu einem Verlust dessen interner Struktur (Mitsui and Schneider, 1976; Mehta et al., 2007).

B.3.2.1 Veränderte Genexpression bei zellulärer Seneszenz

Seneszenz führt in den betroffenen Zellen zu deutlichen Veränderungen in der Genexpression, insbesondere bei Zellzyklusinhibitoren und -aktivatoren (Abb. B.1). Zwei Zellzyklusinhibitoren aus der Familie der *cyclin-dependent kinase inhibitors* (CDKIs), p21 und p16, sind besonders häufig heraufreguliert. Es handelt es sich hierbei um Komponenten von Tumorsuppressor-Signalwegen, die durch p53 bzw. durch das Retinoblastoma-Protein (pRb) reguliert werden.

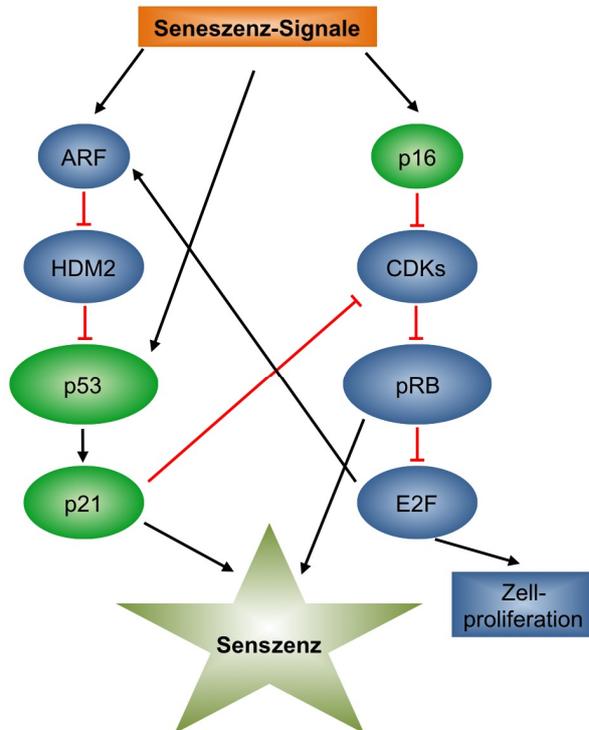


Abb. B.1: Signalwege, die zur zellulären Seneszenz führen. Durch verschiedene Signale (DNA-Schäden, verkürzte Telomere, onkogener Stress, etc.) werden die beiden Haupt-Signalwege entweder gemeinsam oder auch einzeln aktiviert. Häufig wird zunächst der p53-Weg aktiviert und in einem zweiten Schritt der p16/pRB-Weg, was zur Stabilisierung des seneszenten Zustands führt.

Beide Wege können sowohl unabhängig voneinander als auch in Kombination zur Ausbildung und Aufrechterhaltung des seneszenten Phänotyps führen. Während p21 direkt von p53 aktiviert wird (Jackson and Pereira-Smith, 2006) und auf diesem Wege zur Ausbildung des seneszenten Phänotyps führt, verhindert p16 auf der pRb-Achse die Phosphorylierung und Inaktivierung von pRb (Gil and Peters, 2006), wodurch schließlich ebenfalls die Seneszenz eingeleitet wird.

Neben den erwähnten Proteinen, die die Seneszenz einleiten, wurden noch eine Reihe weiterer Marker etabliert, anhand derer sich seneszente Zellen identifizieren lassen. Seneszente Zellen stellen bekanntlich die DNA-Synthese ein, was sich beispielsweise über Bromodesoxyuridin (BrdU) oder über Immunfärbungen von Proliferationsmarkern wie *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) oder Ki-67 feststellen lässt. Bei diesen Methoden ist jedoch keine Unterscheidung zwischen seneszenten, quieszenten oder post-mitotischen Zellen möglich. Ein spezifischerer Nachweis von seneszenten Zellen beruht auf der Detektion der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) (Dimri et al., 1995). Dies ist derzeit der am häufigsten verwendete Nachweis für Seneszenz, wobei auch dieser Test nicht zu 100 % spezifisch ist, da

auch andere Faktoren, wie etwa konfluente Kulturen, zu einer Erhöhung der SA- β -Gal-Aktivität führen können. Die SA- β -Gal ist kein eigenständiges Enzym, vielmehr handelt es sich hierbei um die lysosomale β -Galaktosidase, deren Aktivität jedoch stark erhöht ist und die Zunahme des lysosomalen Volumens in seneszenten Zellen widerspiegelt (Lee et al., 2006). Zelluläre Seneszenz kann häufig auch anhand von sogenannten Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHFs) (Narita et al., 2003) oder Seneszenz-assoziierten *DNA-damage foci* (SDFs) (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004; Di Micco et al., 2006) festgestellt werden. SAHFs können unkompliziert über DNA-Farbstoffe wie DAPI nachgewiesen werden, sind jedoch kein hinreichender Marker, da sie auch in proliferierenden Zellen häufig vorkommen. SDFs enthalten Proteine, die bei DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind, wie etwa das *p53-binding protein-1* (53BP1) oder das phosphorylierte Histon H2AX (γ -H2AX).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass bisher kein spezifischer einzelner Marker bekannt ist, um seneszente Zellen zweifelsfrei zu identifizieren. Vielmehr ist es nötig, unterschiedliche morphologische, funktionale und biochemische Marker in Kombination auszuwerten, um falsch-positive oder -negative Ergebnisse auszuschließen.

B.3.2.2 Vergleich der zellulären Seneszenz in Maus und Mensch

Eukaryotische Zellen verlieren aufgrund ihrer linearen Chromosomen in der Regel mit jeder Zellteilung ein Stück telomerischer DNA. Eine Ausnahme bilden die Keimzellen und Stammzellen in vielen regenerativen Geweben, die durch die Expression des Enzyms Telomerase die fortschreitende Verkürzung der Telomere verhindern. Der Verlust der Telomer-DNA führt ab einer gewissen minimalen Länge zu genomischer Instabilität und schließlich zu Krebs. Um dies zu verhindern, durchlaufen humane Fibroblasten das Seneszenzprogramm, bevor die kritische Länge der Telomere erreicht ist. (Rodier et al., 2005). Diese Telomer-abhängige Seneszenz wird auch als intrinsische Seneszenz bezeichnet. Sie kommt in den meisten somatischen Zellen vor, die keine Telomerase exprimieren, und sie ist auch der Grund für die begrenzte Zahl an Zellverdopplungen von *in-vitro* kultivierten Zellen.

Auch murine embryonale Fibroblasten (MEF) besitzen eine limitierte Teilungsfähigkeit in Kultur. Im Gegensatz zu humanen Fibroblasten wird bei kultivierten Maus-Zellen allerdings nicht von einer intrinsisch induzierten Seneszenz ausgegangen, sondern vielmehr scheinen hier extrinsische Faktoren wie die Kulturbedingungen verantwortlich für die Ausbildung der zellulären Seneszenz zu sein (Sherr and DePinho, 2000; Wright and Shay, 2000). Im Vergleich zu humanen Telomeren (5 – 15 kb) sind murine Telomere sehr lang (40 – 60 kb), wodurch es sehr unwahrscheinlich erscheint, dass replikative Seneszenz in Mauszellen durch Telomerverkürzung ausgelöst wird. Seneszente MEF, die unter Standardbedingungen bei 20 % O₂ kultiviert werden, zeigen Anzeichen für oxidativen Stress, wie etwa DNA-Schäden. Humane Zellen erwerben unter diesen Bedingungen dagegen deutlich weniger solcher Schäden. Werden

MEF dagegen mit reduzierter O₂-Konzentration (3 %) kultiviert, was eher den physiologischen Gegebenheiten im Organismus entspricht, treten MEF nicht spontan in die replikative Seneszenz ein (Parrinello et al., 2003) und können sich weiter teilen. Murine Zellen reagieren folglich deutlich sensibler auf oxidativen Stress als humane Zellen.

Neben oxidativem Stress können auch eine Reihe weiterer extrinsischer Faktoren zelluläre Seneszenz induzieren, so etwa UV- oder Röntgenstrahlung, H₂O₂ oder eine deregulierte Expression von Onkogenen oder Tumorsuppressoren (Campisi, 2001). Im Allgemeinen spricht man von extrinsischer Seneszenz, wenn das Seneszenzprogramm trotz funktionaler Telomere abläuft. Dies ist beispielsweise bei MEF der Fall, die über längere Zeit unter Standardbedingungen kultiviert werden. An der extrinsischen Seneszenz sind maßgeblich die beiden Signalwege der p53- und der p16-pRb-Achse beteiligt. Im Unterschied zu humanen Fibroblasten, bei denen p21 für die replikative Seneszenz unverzichtbar ist, altern MEF aus p21-Knockout-Mäusen normal (Pantoja and Serrano, 1999). Im Gegensatz dazu ist auch bei Mäusen ein funktionales p53-Protein für die Seneszenz notwendig, da p53-Knockout-MEF unter Standardkulturbedingungen keine Seneszenz ausbilden (Harvey et al., 1993; Kamijo et al., 1997). Anders als beim Menschen scheint p21 in der Maus demnach keine entscheidende Rolle in der Seneszenz zuzukommen. Demzufolge müssen andere Faktoren *downstream* von p53 für das limitierte Wachstum von MEF verantwortlich sein, die allerdings noch nicht genauer bestimmt werden konnten.

Andererseits muss man bei der Interpretation von Daten aus Knockout-Experimenten sehr vorsichtig vorgehen. Findet ein Knockout bereits in der Keimbahn statt, so kann die jeweilige Genfunktion unter Umständen von einem anderen Gen übernommen und der Verlust dadurch kompensiert werden. Demnach könnte beispielsweise auch die Fähigkeit zur Seneszenz bei p21-defizienten MEF durch kompensatorische Mechanismen aufrechterhalten werden. Zudem treten nicht nur speziesspezifische Unterschiede auf, sondern auch verschiedene humane Fibroblastentypen wie WI-38- und BJ-Fibroblasten unterscheiden sich in der Ausprägung ihrer Seneszenz (Itahana et al., 2003). Während seneszente WI-38-Zellen hohe Mengen p16 exprimieren, ist dies bei BJ-Fibroblasten nicht der Fall. Die p21-Expression ist dagegen in beiden Fibroblastentypen erhöht.

Zelluläre Seneszenz stellt somit einen wichtigen Tumorsuppressormechanismus dar, dessen Regulation sich allerdings zwischen verschiedenen Spezies, wie etwa zwischen Mensch und Maus, nicht unerheblich unterscheidet. Selbst zwischen verschiedenen Zelltypen einer Spezies können hier deutliche Unterschiede auftreten, wie die Vergleiche zweier Fibroblasten-Subtypen ergaben (Itahana et al., 2003). Um die Regulation der zellulären Seneszenz vollständig zu entschlüsseln, ist noch beträchtlicher Forschungsaufwand vonnöten. Die zelluläre Seneszenz wird neben ihrer Funktion als Tumorsuppressormechanismus auch als eine Komponente des Alterns auf Organismusebene angesehen. Daher erscheint es sehr interessant, Faktoren zu finden, welche die Seneszenz begünstigen oder verlangsamen, um dieses Wissen für Therapieziele einzusetzen. Zu den der Seneszenz entgegenwirkenden Stoffen gehört

beispielsweise das Signalmolekül *insulin-like growth factor I* (IGF-I), für das im Mausmodell gezeigt wurde, dass es das Einsetzen der Seneszenz hinauszögern kann (Chakravarthy et al., 2000). Wie andere sezernierte lysosomale Proteasen auch, enthält (Pro-)Cathepsin X Glykosylierungsstellen für Mannose-6-Phosphat (M6P) (Nägler and Menard, 1998). Es ist somit sehr plausibel, dass (Pro-)Cathepsin X über seine M6P-Reste mit IGF-II/M6P-Rezeptoren interagieren und dadurch Einfluss auf die IGF-Signaltransduktion nehmen kann. Auf diesem Wege sind in der Folge auch Auswirkungen auf die Ausbildung der Seneszenz denkbar.

B.4 Das IGF-System

Das *insulin-like growth factor* (IGF)-System ist ein komplexes Signaltransduktionssystem, das eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und -proliferation sowie beim Schutz vor Apoptose spielt. Es besteht aus 3 Liganden (IGF-I, IGF-II und Insulin) und 3 Transmembranrezeptoren (IGF-I-Rezeptor (IGF-IR), IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR) und Insulinrezeptor (IR)) (Abb. B.2). Zusätzlich existieren noch 6 IGF-Bindeproteine (IGFBP1-6), auf die hier jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht näher eingegangen werden soll. Der IGF-I-Rezeptor ist ein Typ-2-Tyrosinkinase-Rezeptor und weist eine Sequenzhomologie von 60 % zum Insulin-Rezeptor auf. Im Gegensatz zu diesen beiden Rezeptoren löst der IGF-II-Rezeptor, der mit dem Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rezeptor identisch ist, keine Signaltransduktion aus. Vielmehr bindet er IGF-II (und mit deutlich niedriger Affinität auch IGF-I) und Mannose-6-Phosphat-haltige Proteine für die Internalisierung und die Zuführung zum Lysosom, sodass die Interaktionsmöglichkeiten von IGF-II mit dem IGF-IR reduziert werden. Dadurch wirkt der M6PR/IGF-IIR der Aktivierung des IGF-IR entgegen und besitzt somit antiproliferative Eigenschaften (Moschos and Mantzoros, 2002).

IGF-I und IGF-II binden mit ähnlichen Affinitäten an den IGF-I-Rezeptor, die exakten Werte können sich aber je nach Zelltyp und experimentellen Bedingungen leicht unterscheiden. So ergaben Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen eine 4-fach höhere Affinität von IGF-I gegenüber IGF-II (Forbes et al., 2002), während die Bindungsaffinitäten in adulten bovinen chromaffinen Zellen identisch sind (Danielsen et al., 1990). Umgekehrt kann IGF-I auch an den IGF-II-Rezeptor binden, allerdings mit deutlich niedrigerer Affinität als IGF-II (Moschos and Mantzoros, 2002). Insulin bindet ebenfalls an den IGF-I-Rezeptor, und im Gegenzug kann IGF-I an den Insulin-Rezeptor binden. Im Vergleich zu ihren eigentlichen Rezeptoren liegen diese Affinitäten jedoch ca. 1000-fach (Clemmons, 2006; Zelobowska et al., 2009) bzw. 100-fach (Ullrich et al., 1986) niedriger. Interessanterweise kann auch IGF-II an den Insulin-Rezeptor (Subtyp A) binden, wodurch wahrscheinlich ein spezieller Signalweg ausgelöst wird, der *downstream* des Rezeptors andere Signalmoleküle aktiviert als bei einer Stimulation mit Insulin. (Bäck et al., 2011; Morcavallo et al., 2011). Schließlich wird die Komplexität dieses Systems

durch die IGF-BPs weiter erhöht, indem diese die biologische Verfügbarkeit und Aktivität der IGFs modulieren (Jones and Clemmons, 1995).

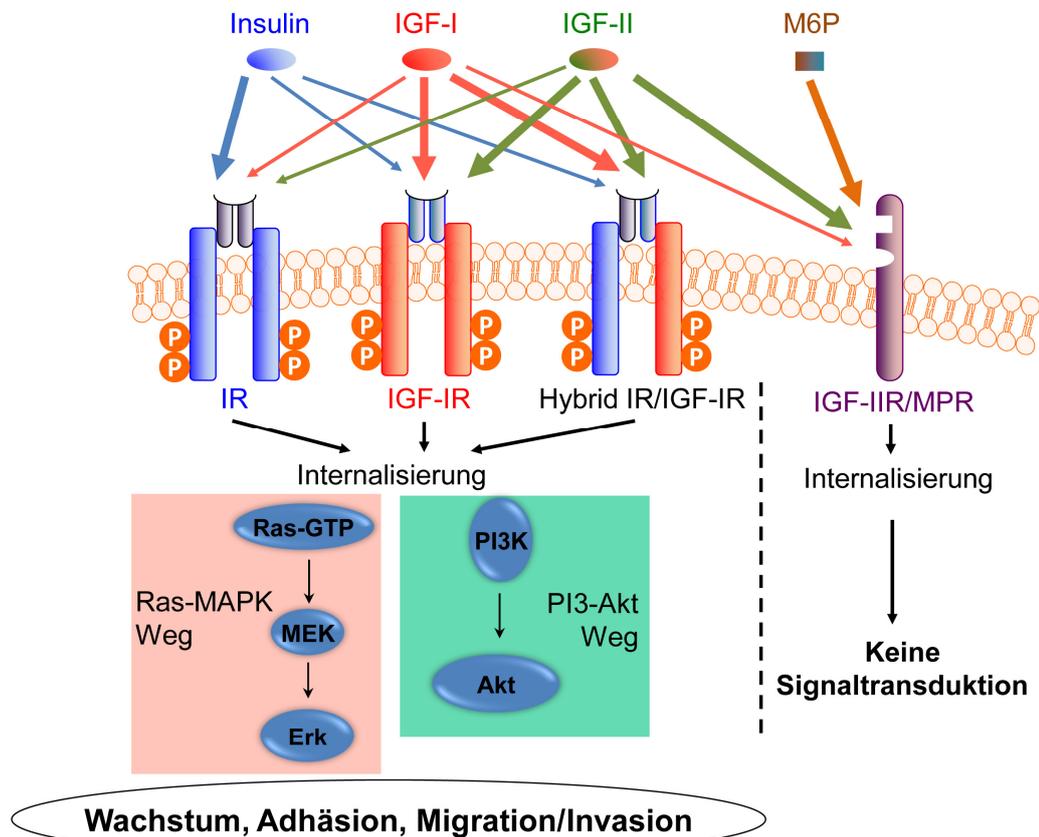


Abb. B.2: Übersicht über das IGF-System. Neben den homodimeren Insulinrezeptoren (IR) bzw. IGF-I-Rezeptoren (IGF-IR) kommen häufig auch Hybridrezeptoren vor, die aus Dimeren beider Rezeptortypen bestehen. Die Liganden Insulin, IGF-I und IGF-II binden an diese Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten und lösen zunächst eine Autophosphorylierung der β -Untereinheit aus, was schließlich zu nachgeschalteten Signaltransduktionsmechanismen führt. Im Gegensatz dazu leitet der IGF-IIR/MPR (IGF-II-Rezeptor/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) keine Signale weiter, sondern führt die gebundenen Liganden dem Lysosom zu.

B.4.1 Signaltransduktion über den IGF-I-Rezeptor

Der IGF-I-Rezeptor wird durch Ligandenbindung aktiviert, was zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten im intrazellulären Teil seiner β -Untereinheit führt. Daraufhin können verschiedene Rezeptorsubstrate, wie die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) 1-4 und *Src homology 2 domain containing* (Shc), rekrutiert werden (Butler et al., 1998; Samani and Brodt, 2001), welche als Ausgangspunkt für Phosphorylierungskaskaden zur Weiterleitung des IGF-Signals dienen. Über IRS-1 kann dann eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) erfolgen, wodurch weitere Substrate, wie die p70-S6-Kinase oder die Proteinkinase B (Akt),

aktiviert werden (Giorgetti et al., 1993). Akt-Phosphorylierung erhöht die Proteinsynthese über mTOR und löst anti-apoptotische Effekte durch die Phosphorylierung und Inaktivierung von Bad aus (Petley et al., 1999). Neben den PI-3K-abhängigen Signalwegen leiten IRS-1 oder Shc die Aktivierung des Raf-1/MEK/ERK Signalwegs ein, was zur Induktion der zellulären Proliferation führt (Hermanto et al., 2000; Grey et al., 2003).

In einigen Zelltypen kann der IGF-I-Rezeptor auch direkt die Janus-Kinasen (JAK) 1 und 2 phosphorylieren, die in Cytokin-aktivierten Signalwegen eine Rolle spielen (Gual et al., 1998). Zu weiteren Effektoren *downstream* des IGF-IR gehören auch die Tyrosinkinase Src (Sekharam et al., 2003), die *focal adhesion kinase* (FAK) (Baron et al., 1998) und die Proto-Onkogene c-Crk II und CrkL (Beitner-Johnson and LeRoith, 1995; Koval et al., 1998), die an der Regulation der Zellform und -motilität beteiligt sind. Aufgrund ansteigender Calciumspiegel infolge von IGF-I-Stimulation wird auch der Phospholipase C- γ eine Beteiligung an der IGF-IR-abhängigen Signalweiterleitung zugesprochen (Rubin and Baserga, 1995). Die tatsächliche Bedeutung dieser Signalwege und der beteiligten Effektoren scheint stark Zelltyp-abhängig zu sein und bedarf weiterer Aufklärung.

B.4.2 Zellzyklusregulation durch den IGF-I-Rezeptor

Der IGF-I-Rezeptor kontrolliert mehrere Zellzyklus-*Checkpoints* und ist dadurch maßgeblich an der Regulation der Zellzyklusprogression beteiligt. So führt die Aktivierung der p70-S6-Kinase zur Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins und damit zu vermehrter Ribosomenbildung. Dies wiederum ist eine wichtige Voraussetzung für den Eintritt in den Zellzyklus beim G₀-G₁-Übergang (Dupont et al., 2003).

Vor allem der G₁-S-Übergang wird durch den IGF-IR reguliert. Die Aktivierung des Rezeptors führt über mehrere Schritte zu einer Zunahme von Cyclin D1 und der *cyclin-dependent kinase* (CDK) 4, die den Eintritt in die S-Phase begünstigen. Weiterhin wird dadurch das auch an zellulärer Seneszenz beteiligte Retinoblastoma-Protein phosphoryliert, der Transkriptionsfaktor E2F abgebaut sowie Cyclin E verstärkt synthetisiert (Rosenthal and Cheng, 1995; Dupont et al., 2000).

Die dafür notwendige Cyclin D1-Synthese kann über verschiedene alternative Mechanismen durch den IGF-I-Rezeptor vermittelt werden. Eine Option stellt der ERK-Signalweg dar, der die Cyclin D1-Menge auf transkriptioneller Ebene reguliert (Lavoie et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit führt über Aktivierung von PI-3K/Akt, was einer in einer Erhöhung der mRNA-Stabilität von Cyclin D1 resultiert (Hamelers et al., 2002). Der PI-3K-Weg kann die Cyclin D1-Menge zusätzlich über eine erhöhte mTOR-gesteuerte Proteintranslation beeinflussen. Daneben kann nicht nur die Menge, sondern auch die Aktivität von Cyclin D1 über die PI-3K erhöht werden. Dies geschieht durch eine Inhibition der Glycogensynthase-Kinase-3-abhängigen

Phosphorylierung von Cyclin D1 (Diehl et al., 1998; Muise-Helmericks et al., 1998; Hamelers et al., 2002).

Eine weitere regulatorische Funktion kommt dem IGF-I-Rezeptor beim Übergang von G_2 zu M zu. Entscheidend für diese Transition scheint eine IGF-I-abhängige Erhöhung der Cycline A und B sowie von Cdc2 zu sein (Furlanetto et al., 1994). Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass das IGF-System die Zellzyklusprogression in verschiedenen Phasen positiv regulieren kann, wobei der Hauptanteil wahrscheinlich auf die G_1 -S-Transition fällt, welche durch PI-3K/Akt und ERK vermittelt wird.

B.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Zu Beginn dieser Dissertation war noch sehr wenig über die verschiedenen Funktionen von Cathepsin X bekannt. Die hohe Cathepsin X-Expression und -Sekretion einiger Tumorarten ließ jedoch darauf schließen, dass dieser Protease neben ihrer Beteiligung an der lysosomalen Proteindegradation noch weitere Bedeutung - insbesondere bei Invasions-/Migrations-Prozessen - zukommt. Um dieser Frage nachzugehen, sollten zu Beginn Zellkulturmodelle etabliert werden, anhand derer anschließend die Bedeutung von Cathepsin X untersucht werden sollte.

1. Cathepsin X-Defizienz in verschiedenen Zelltypen

Zunächst sollte ein siRNA-induzierter Knockdown von Cathepsin X in humanen Fibroblasten (NHDF) und Prostatakarzinomzellen (PC-3, LNCaP) etabliert werden, um in einem nächsten Schritt den Einfluss der Protease auf die Invasion und Migration analysieren zu können. Zum Vergleich sollten die Experimente auch mit embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF) aus Cathepsin X^{-/-}-Mäusen durchgeführt werden.

2. Charakterisierung des Phänotyps Cathepsin X-defizienter Zellen

Cathepsin X-defiziente Fibroblasten sollten hinsichtlich ihres Phänotyps charakterisiert werden. Da Cathepsin X-defiziente Fibroblasten auf den ersten Blick Merkmale seneszenten Zellen aufwiesen, sollten diese auf Seneszenz-typische Aspekte wie Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität, veränderte Genexpression und verminderte Proliferation genauer untersucht werden.

3. Rescue des Phänotyps durch exogene Cathepsin X-Expression

Um die beobachteten Veränderungen in den Zellen ausschließlich auf die Cathepsin X-Defizienz zurückzuführen und unspezifische Effekte auszuschließen, sollte der siRNA-vermittelte Cathepsin X-Knockdown durch gleichzeitige exogene Expression mittels eines Cathepsin X-Expressionsplasmids aufgehoben werden. Durch die Verwendung von Expressions-Konstrukten ohne die 3'-untranslatierte Region (UTR) sowie siRNAs mit Zielsequenzen in ebendieser Region sollte sichergestellt werden, dass ausschließlich die endogene mRNA durch die siRNA erkannt wird, die exogene Cathepsin X-Expression aber ungehindert ablaufen kann. Die so behandelten Zellen sollten nun auf einen *Rescue* des seneszenten Phänotyps untersucht werden.

4. Aufklärung der durch Cathepsin X-Downregulation beeinflussten Signalwege

Desweiteren sollte untersucht werden, welche Signalwege durch die Cathepsin X-Defizienz beeinflusst werden. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der durch die Downregulation verursachten Veränderungen sollte durch Untersuchungen an Fibroblasten und Prostata-

karzinomzellen umgesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde der Fokus auf Signalwege wie den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)- Weg oder das *insulin-like growth factor* (IGF)-System gelegt, die entscheidende Komponenten in der Regulation von Zellzyklus und Invasion/Migration darstellen.

C Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Geräte

Autoklav

3850

Systemec GmbH, Wetztenberg

CO₂-Inkubator

Jouan IG 150

Jouan GmbH, Unterhaching

Durchflusscytometer

EPICS XL

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Eismaschine

AF-10

Scotsman, Frimont, Italien

Elektroporation

GenePulser mit

BIO-RAD, Hercules, USA

Capacity Extender

BIO-RAD, Hercules, USA

Pulse Controller

BIO-RAD, Hercules, USA

Gel-Bilderfassung

Gel Imager

Intas GmbH, Göttingen

Horizontale DNA Elektrophoreseapparatur

HE 33 mini *submarine unit*

Hofer, Heidelberg

Magnetrührer

Ika Combimag RCO

Janke & Kunkel, Staufen

Ikamag RET

Janke & Kunkel, Staufen

Mikrotiterplatten-Lesegerät

Asys DigiScan

Microtec Laborsysteme, Overath

Mikroskope

IX70 mit

Olympus, Feldkirchen-Westerham

CCD SensiCam QE

PCO AG, Kehlheim

Uniblitz VCM-D1 Shutter

Vincent Associates, Rochester, USA

UV-Lampe BH2-RFL-T3

Olympus, Feldkirchen-Westerham

Axioskop mit

Carl Zeiss, Jena

UV-Lampe AttoArc HBO 100W

Atto Instruments, Rockeville, USA

Mikrowellenofen

R-6270

Sharp, Osaka, Japan

Orbitalschüttler

Certomat R

Braun Biotech International, Melsungen

Infrons TR150 mit

Infrons AG, Bottingen, Schweiz

Heissluft Inkubatorofen ITE

Infrons AG, Bottingen, Schweiz

PCR Thermal Cycler

Gene Amp 2400

Perking Elmer, Langen

Light Cycler II

Roche, Mannheim

T personal

Whatman Biometra, Göttingen

ph-Meter

Typ 114D mit

WTW, Weilheim

pH Elektrode

Ingold, Steinbach-Taunus

Proteintransfereinheiten

FastBlot B33

Whatman Biometra, Göttingen

Sicherheitswerkbänke

BDK 7419, Modell UVF 6.18S

BDK. Sonnenbühl-Genkingen

Herasafe Typ HS12

Heraeus Instruments, Göttingen

Spannungsquellen

EPS 500/400

Pharmacia, Freiburg

Mighty Slim

Hofer, Heidelberg

Stickstofftank

Locator 4

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Spektrophotometer

NanoDrop 1000

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Spektrofluorimeter

Safire 2

Tecan, Crailsheim

Vortexer

Vortex Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Waagen

Analysenwaage A 120 S

Sartorius, Göttingen

Technische Waage, MA AF200

Sartorius, Göttingen

Zentrifugen

Eppendorf 5415 R

Eppendorf, Hamburg

Varifuge 3.0 R

Heraeus Sepatech, München

Sepatech Biofuge 15

Heraeus Sepatech, München

C.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

Image-Pro Plus

Media Cybernetics, Silver Spring, USA

ImageJ

National Institutes of Health, USA

Light Cycler Software 3.5

Roche, Mannheim

Magic Scan V4.4

Pharmacia, Freiburg

MikroWin2000 V4.0

Microtek Laborsysteme, Overath

XFluor4 Safire2

Tecan, Crailsheim

C.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt wurden, hatten „p.a.“ Qualität und wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

C.1.3.1 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Methoden

Agarose Seakem GTG	Biozym, Hameln
iScript cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD, Hercules, USA
Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit	Roche, Mannheim
QIAfilter Plasmid Midi- und Maxiprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
XL10-Gold® Ultracompetent Cells	Stratagene, La Jolla, USA

C.1.3.1.1 Vektoren

H. sapiens Expressions-Vektor: pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen, Karlsruhe)

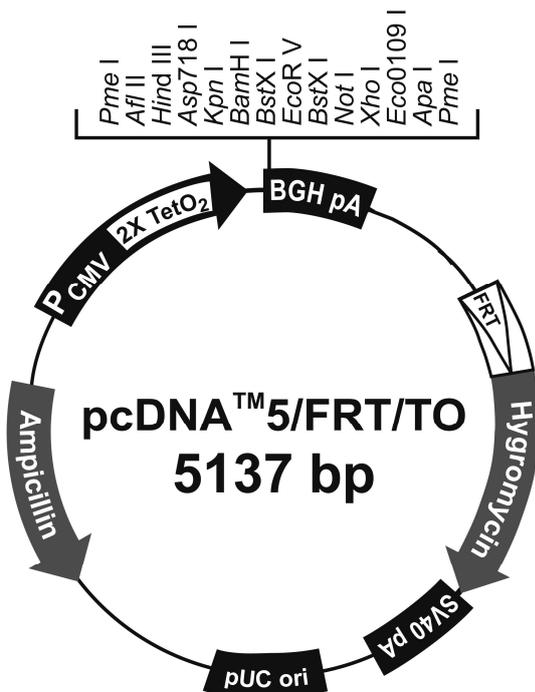


Abb. C.1: Schematische Darstellung des *H. sapiens* Expressions-Vektors pcDNA5/FRT/TO. Dieser Vektor wurde als Expressionsvektor für Cathepsin X in NHDF verwendet. Das Cathepsin X-GFP-Fusionskonstrukt wurde in die *HindIII* und *XhoI* Schnittstellen des Vektors kloniert. P_{CMV} = konstitutiver Promotor aus dem Cytomegalie Virus, TetO₂ = Tet Operator 2 (Bindungsstelle für den Tet-Repressor), pUC ori = pUC19 Replikationsursprung, BGH pA = Polyadenylierungssignal des *Bovine Growth Hormone*-Gens, SV40 pA = Polyadenylierungssignal aus dem *Simian Virus 40*, FRT = Flp recognition target.

C.1.3.1.2 Oligonukleotide**Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR**

Alle Oligonukleotide für Cathepsine sowie für *House-Keeping*-Gene zur Normierung wurden von der Firma SearchLC (Heidelberg) bezogen.

Alle weiteren Oligonukleotide für quantitative RT-PCR stammten von Qiagen (Hilden).

siRNA Oligonukleotide

Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung aufgeführt.

Negativkontrolle (Non-silencing siRNA)

Zielsequenz	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT
Sense	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT
Antisense	ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT

Cathepsin X304 (= Cat X siRNA #1)

Zielsequenz	AAC GGA TCG GAT CAA CAT CAA
Sense	CGG AUC GGA UCA ACA UCA AdTdT
Antisense	UUG AUG UUG AUC CGA UCC GdTdT

Alle weiteren siRNA-Oligonukleotide waren vorgefertigte Konstrukte der Firma Qiagen (Hilden):

HS CTSZ 4 (= Cat X siRNA #2)

Best.-Nr.: SI00025529

Zielsequenz	TCG GAT CAA CAT CAA GAG GAA
Sense	GGA UCA ACA UCA AGA GGA AdTdT
Antisense	UUG CUC UUG AUG UUG AUC CdGdA

HS CTSZ 9 (= Cat X siRNA #3)

Best.-Nr.: SI05081181

Zielsequenz	ATC GCC CAA GTG ATG AAT AAA
Sense	CGC CCA AGU GAU GAA UAA AdTdT
Antisense	UUU AUU CAU CAC UUG GGC GdAdT

C.1.3.2 Chemikalien und Materialien für Zellkulturtechniken

4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Life Technologies, Darmstadt
5-Brom-2-desoxyuridin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Accutase	PAA, Linz, Österreich
FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, Bedford, USA
Culture Slides (Glas)	BD Biosciences, Bedford, USA
Costar Transwell-Einsätze, 6,5 mm Durchmesser 8 µm Porengröße	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Linz, Österreich
Elektroporationsküvetten 4 mm	Eurogentec, Köln
FGM-2 Bullet Kit	Lonza, Basel, Schweiz
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
HiPerFect	Qiagen, Hilden
Humanes Serum	PAA, Linz, Österreich
LysoTracker Red DND-99	Life Technologies, Darmstadt
Nutridoma-SP	Roche, Mannheim
PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -frei)	PAA, Linz, Österreich
Premo Autophagy Sensor LC3B-GFP	Life Technologies, Darmstadt
RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden

C.1.3.2.1 Zelllinien und primäre Zellen

MEF (murine embryonic fibroblasts) wt und Cat X ^{-/-} (Abb. C.2)	Prof. Dr. C. Peters und Prof. Dr. T. Reinheckel, Universität Freiburg
NHDF neo (normal human dermal fibroblasts, neonatal)	Lonza, Basel, Schweiz
PC-3 (humane Prostatakarzinom-Zelllinie)	ATCC, Manassas, USA

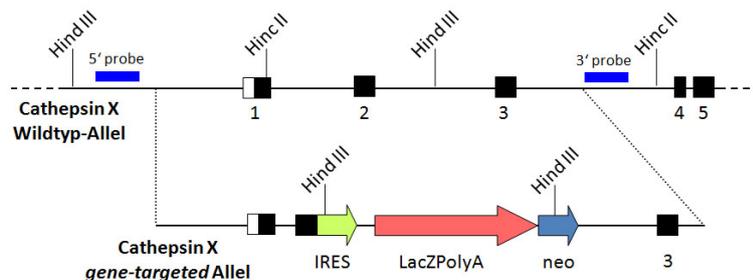


Abb. C.2: Cathepsin X-Konstrukt zur gezielten Deletion in Cathepsin X^{-/-}-Mäusen. Ein Teil von von Exon 2 (enthält das *active site*-Cystein) und Intron 3 wurden durch homologe Rekombination entfernt und durch eine Kasette ersetzt, die eine *independent ribosomal entry sequence* (IRES), ein LacZ-Reportergen mit Polyadenylierungssignal (LacZPolyA) sowie ein Neomycin-Resistenzgen (neo) enthält. (Abb. von Prof. Dr. T. Reinheckel)

C.1.3.3 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken

Albumin Standardlösung	Pierce, Rockford, USA
Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1) 40 %	Carl Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagenz A und B	Interchim, Montluçon, Frankreich
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim
DQ BSA, Fluorescein-konjugiert	Life Technologies, Darmstadt
DQ Kollagen I, Fluorescein-konjugiert	Life Technologies, Darmstadt
DQ Kollagen IV, Fluorescein-konjugiert	Life Technologies, Darmstadt
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies, Darmstadt
Proteasen-Inhibitorcocktail III Calbiochem	Merck, Darmstadt
Senescence β -Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling, Frankfurt
Z-DEVD-AFC	AnaSpec, Fremont, USA
Z-VAD-FMK	Bachem, Bubendorf, Schweiz

C.1.3.4 Antikörper und Konjugate

Antikörper

Maus Anti-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maus Anti-Caveolin-1	Santa Cruz Biotechn., Santa Cruz, USA
Maus Anti-GAPDH	Merck, Darmstadt
Kaninchen Anti-Procathepsin X	Nägler et al., 2006
Kaninchen Anti-SAPK/JNK	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-phospho-SAPK/JNK	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-p38	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-phospho p38	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-p44/42 (ERK)	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-phospho-p44/42	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-MEK	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-phospho-MEK	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-PAK	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-phospho-PAK	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-p85	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-phospho-p85	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-IGF-IR β	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-phospho-IGF-IR β	Cell Signaling, Frankfurt
Ziege Anti-IGF-IIR	R&D Systems, Minneapolis, USA
Maus Anti-p21	Santa Cruz Biotechn., Santa Cruz, USA
Maus Anti-p53	Cell Signaling, Frankfurt
Kaninchen Anti-Ras	Cell Signaling, Frankfurt

Konjugate

Maus Anti-BrdU-FITC	BD Biosciences, Bedford, USA
Ziege Anti-Kaninchen-HRP	Cell Signaling, Frankfurt
Pferd Anti-Maus-HRP	Cell Signaling, Frankfurt
Maus Anti-Schaf/Ziege-HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege Anti-Kaninchen AF488	Life Technologies, Darmstadt
Kaninchen Anti-Maus AF568	Life Technologies, Darmstadt

C.2 Methoden

C.2.1 Proteinbiochemische Methoden

C.2.1.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Für Immunoblot- und ELISA-Analysen erfolgte die Lyse der Zellen in der Regel in einem nicht-denaturierenden Lysepuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, pH 6,0). Kurz vor der Verwendung wurde diesem Puffer ein Proteaseinhibitorcocktail im Verhältnis 1:100 (Calbiochem Inhibitorcocktail Nr. 3, Merck, Darmstadt) zugesetzt. Im Falle der Phosphorylierungsstudien wurden die Zellen in 1x SDS-Probenpuffer (Cell Signaling, Frankfurt) direkt lysiert. Auch diesem Puffer wurde zuvor der Proteaseinhibitorcocktail zugesetzt, ebenso wie Na_3VO_4 (1mM) als Phosphataseinhibitor.

Vor der Lyse wurden die adhärenen Zellen mittels Accutase abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen im Lysepuffer (5×10^6 Zellen/ml) resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle 2-3 Minuten kurz gevortext. Anschließend wurde das Lysat auf Eis für 3 x 2 Sekunden mit der Ultraschalllanze behandelt. Schließlich folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4 °C und 16.000 g, um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt oder sofort analysiert.

Für Untersuchungen der Phosphorylierungszustände von Proteinen im Immunoblot wurden die adhärenen Zellen zunächst mit eiskaltem PBS, das 200 μM Na_3VO_4 als Phosphataseinhibitor enthielt, gewaschen. Die Lyse erfolgte direkt in der Kulturplatte mit 1x SDS-Probenpuffer (Cell Signaling, Frankfurt) (inkl. 40 mM DTT, 1 % (v/v) Calbiochem-Proteaseinhibitorcocktail, 1 mM Na_3VO_4) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers. Die Proben wurden während der Lyse für 10 Minuten auf Eis gehalten, bevor die Proteinextrakte in Reaktionsgefäße überführt und sofort weiterverarbeitet wurden. Es folgte eine 5-minütige Erhitzung auf 95 °C, eine Ultraschallbehandlung auf Eis (3 x 2 Sekunden) und eine anschließende 5-minütige Zentrifugation bei 16.000 g. Die löslichen Bestandteile wurden dann sofort für eine Gelelektrophorese auf ein SDS-Gel aufgetragen.

C.2.1.2 Isolierung des Zellkulturüberstandes

Um die Konzentration an sezerniertem Procathepsin X in Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurde der Überstand abpipettiert und für 10 Minuten bei 400 g abzentrifugiert, um abgelöste Zellen und Zellbestandteile zu entfernen. Wurden die Proben nicht sofort analysiert, erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

C.2.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

In allen Proben, die nicht direkt in SDS-Probenpuffer lysiert wurden, wurde die Proteinkonzentration über die kolorimetrische BCA-Methode bestimmt. Dabei wird die Menge eines blauen Cu^{2+} -Komplexes gemessen, der sich zwischen Peptidbindungen und Bicinchoninsäure (BCA) bildet. Dafür wurden pro Kavität einer 96-Well-Platte 25 μl Probe in geeigneter Verdünnung (meist 1:12,5 – 1:25) mit 200 μl BCA/ Cu^{2+} -Lösung (25:1) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 60 °C. Schließlich wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurden die Absorptionswerte der Proben mit einer BSA (Bovines Serumalbumin)-Standardkurve abgeglichen.

C.2.1.4 Herstellung von Gelen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine aus Zelllysaten wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese angewandt. Trenn- und Sammelgele wurden nach dem in Tabelle C.1 gezeigten Pipettierschema erstellt. Je nach benötigter Auflösung wurden Trenngele mit unterschiedlichen (Bis-)Acrylamidkonzentrationen (8-15 %) gegossen. Beim Trenngelpuffer handelte es sich um 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, der Sammelgelpuffer bestand aus 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8. Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetramethylethylendiamin) eingeleitet.

Die Lysate wurden, falls nicht direkt in SDS Probenpuffer lysiert, mit 3x SDS Probenpuffer + DTT (Cell Signaling, Frankfurt) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen. Vor dem Auftrag auf das Gel erfolgte schließlich noch ein Zentrifugationsschritt für 10 Sekunden bei 5000 rpm, bei dem letzte unlösliche Bestandteile sedimentiert wurden. Der Laufpuffer bestand aus 250 mM Tris/HCl, 192 mM Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3.

Tabelle C.1: Pipettierschema für die Herstellung von Gelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE. In der Tabelle sind die verwendeten Volumina der Komponenten für die SDS-Gele unterschiedlicher Konzentrationen aufgeführt. TEMED und APS wurden kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben.

	Trenngel für 2 Gele à 0,75 mm oder 1 Gel à 1,5 mm Dicke				Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	15 %	
dH₂O	5,5 ml	5 ml	4,5 ml	3,75 ml	5.675 ml
Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
40 % (w/v) Bis-)Acrylamid	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,75 ml	1,65 ml
10 % (w/v) SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
TEMED	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
10 % (w/v) APS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl

C.2.1.5 Proteinnachweis mittels Immunoblot-Analyse

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die im Gel enthaltenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert. Für das *semi-dry*-Elektrotransferverfahren wurden Gel, Whatman-Filterpapiere und Nitrozellulosemembran für 5 Minuten in Transferpuffer (45 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0,00375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) vorinkubiert und anschließend wie folgt aufgebaut: ANODE – 9 Lagen Filterpapier – Nitrozellulosemembran – Gel – 9 Lagen Filterpapier – KATHODE. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 – 200 mA für 1,5 – 3 Stunden, je nach Molekulargewicht des Zielproteins.

Für die folgende Immundetektion der Zielproteine wurde die Membran für 3 x 15 Minuten bei RT auf dem Horizontalschüttler in TBST (65 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween) mit 3 % (w/v) BSA inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C zur Bindung an

das Zielprotein inkubiert. Die jeweilige Antikörperverdünnung ist Tabelle C.2 zu entnehmen. Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch Abspritzen mit dH₂O, gefolgt von einer Waschprozedur mit TBST (3 x 10 Minuten) entfernt. Der sekundäre, HRP (*horse radish peroxidase*)-konjugierte Antikörper wurde im Verhältnis 1:20.000 in TBST verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Membran gegeben. Nach erneutem Waschen mit dH₂O und TBST erfolgte die Detektion der Zielproteine über eine 5-minütige Inkubation in einer Luminol/H₂O₂-Lösung und anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms.

Tabelle C.2: Verdünnungen der im Western Blot eingesetzten Antikörper. Details siehe Text. Die genaue Bezeichnung und Herkunft der Antikörper bzw. HRP-Konjugate sind in C.1.3.4 angegeben

Antigen	Spezies	Verdünnung
Aktin	Maus	1 : 500
Caveolin-1	Maus	1 : 200
GAPDH	Maus	1 : 20.000
Procathepsin X	Kaninchen	1 : 3.000
SAPK/JNK	Kaninchen	1 : 1.000
phospho-SAPK/JNK	Kaninchen	1 : 1.000
p38	Kaninchen	1 : 1.000
phospho-p38	Kaninchen	1 : 1.000
p44/42/ERK	Kaninchen	1 : 1.000
phospho-p44/42/ERK	Kaninchen	1 : 1.000
MEK	Kaninchen	1 : 1.000
phospho-MEK	Kaninchen	1 : 1.000
PAK	Kaninchen	1 : 1.000
Phospho-PAK	Kaninchen	1 : 1.000
p85	Kaninchen	1 : 1.000
phospho-p85	Kaninchen	1 : 1.000
IGF-IR β	Kaninchen	1 : 1.000
phospho-IGF-IR β	Kaninchen	1 : 1.000
IGF-IIR	Ziege	1 : 1.000
p21	Maus	1 : 200
p53	Maus	1 : 250
Ras	Kaninchen	1 : 1.000

C.2.1.6 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brilliantblau

Zur zusätzlichen optischen Kontrolle des Proteinauftrags im SDS-Gel wurden die Gele im Anschluss an die Blotting-Prozedur mit einer Coomassie-Brilliantblau-Lösung (0,5 % (w/v) Coomassie Blau G-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol) für 10 Minuten auf einem Horizontalschüttler bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte das Entfärben des Gels in einer Entfärberlösung (10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol) für 2-3 Stunden. Danach wurden die Gele zunächst für 15 Minuten in dH₂O, und anschließend in Trocknungslösung (20 % (v/v) Methanol, 2 % Glycerin) inkubiert. Schließlich wurde das Gel zwischen zwei Cellophanblättern eingespannt und bei RT getrocknet.

C.2.1.7 Quantitative Bestimmung von Cathepsin X mittels Sandwich-ELISA

Der in dieser Arbeit verwendete Sandwich-ELISA zum Nachweis von (Pro)Cathepsin X wurde bereits veröffentlicht (Nägler et al., 2006). Die Durchführung wird im Folgenden kurz beschrieben:

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cathepsin X (Kaninchen IgG) beschichtet, der in unserem Labor isoliert wurde. Dazu wurden 10 µl Antikörperlösung in 10 ml Beschichtungspuffer (15,9 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6) verdünnt und 100 µl je Vertiefung eingesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Nachdem die Beschichtungslösung ausgeklopft wurde, wurde 5 x mit je 200ml Waschpuffer (150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 10 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,05 % (w/v) Tween 20, pH 7,4) gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 100 µl Blockierungspuffer je Kavität inkubiert (Waschpuffer + 4 % (w/v) BSA). Vor dem Auftrag der Proben wurden die Kavitäten noch 2 x mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Standard und Proben wurden in Probenpuffer verdünnt (Waschpuffer + 2 % (w/v) BSA) und 100 µl je Well aufgetragen. Die Bindung erfolgte bei RT für 1 Stunde auf dem Schüttler (100 rpm). Anschließend wurde die Platte 5 x mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen, bevor mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cathepsin X (Ziege IgG; R&D Systems, Mineapolis, USA) in einer 1:200-Verdünnung in Probenpuffer für 1 Stunde bei RT inkubiert wurde (Schüttler). Nachdem die Platte 5 x gewaschen wurde, wurde für 1 Stunde bei RT ein Peroxidasegekoppelter Antikörper gegen Ziege (Sigma) in der Verdünnung 1:20.000 eingesetzt. Die Kavitäten wurden erneut 5 x gewaschen und schließlich erfolgte die Detektion mit jeweils 100 µl TMB (Tetramethylbenzidin), welches für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert wurde. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 1 M H₂SO₄ wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

C.2.1.8 Messung der Apoptose über die Caspase 3-Aktivität

Zur Bestimmung der Apoptose in einer Kultur wurde die Caspase 3-Aktivität in Zelllysaten nach dem Protokoll von Denault und Salvesen (Denault and Salvesen, 2003; Denault et al., 2007) gemessen. Zunächst wurden 100.000 Zellen je Vertiefung einer 6-Well-Plate ausgesät und über

Nacht inkubiert. Als Positivkontrolle diente Staurosporin (500 nM), welches für 6 Stunden in das Wachstumsmedium gegeben wurde. Die Zellen wurden in hypoosmotischem Lysepuffer (20 mM PIPES, 20 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, pH 7,4) lysiert, wobei pro 6-Well 100 µl Puffer pipettiert wurden und die Zellen zusätzlich mit einem Zellschaber abgelöst wurden. Nach dem Transfer in 1,5 ml-Reaktionsgefäße wurde das Lysat mehrmals kurz gevortext und mit der Ultraschalllanze (3 x 2 Sekunden) behandelt. Dabei wurden die Proben ständig auf Eis gehalten. Schließlich wurden die Zelltrümmer bei 16.000 g und 4 °C für 5 Minuten sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Für die enzymkinetische Messung wurden je Kavität einer 96-Well-Platte 50 µl 2x Caspasepuffer (20 mM PIPES, 200 mM NaCl, 20 mM DTT, 20 % (w/v) Saccharose, 0,2 % (w/v) CHAPS, 2mM EDTA, pH 7,2) vorgelegt. Es folgten jeweils 20 µl Lysat und 10 µl Inhibitor (10 µM Z-VAD-FMK, Bachem, Bubendorf, Schweiz) bzw. Wasser. Für die Äquilibrierung fand eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C statt. Die Arbeitsverdünnung des Substrats (500 µM Z-DEVD-AFC, AnaSpec, Fremont, USA) wurde ebenfalls auf 37 °C vorgewärmt. Schließlich wurden 20 µl des Substrats zugegeben. Die Messung wurde sofort gestartet ($\lambda_{\text{Excitation}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 500 \text{ nm}$) und die Fluoreszenzentwicklung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich in einem Plattenfluorimeter verfolgt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Wasserkontrolle (Puffer + Wasser) und eine Hintergrund-Kontrolle (Puffer + Substrat + Wasser) mitgeführt. Zur Quantifizierung wurde der Fluoreszenzanstieg pro Sekunde berechnet und mit der im BCA-Assay ermittelten Proteinkonzentration normalisiert.

C.2.1.9 Untersuchung der SA- β -Galaktosidase-Aktivität

Die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) wurde mit Hilfe des *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* (Cell Signaling, Frankfurt) bestimmt. NHDF wurden 2 Tage nach Transfektion zu 60.000 Zellen je Kavität einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers fixiert und über Nacht bei 37 °C mittel X-Gal gefärbt. Nun wurden die Kulturen unter dem Mikroskop fotografiert und die Intensität der Färbung jeder Zelle manuell bestimmt. Zur Berechnung des Färbeindex wurden für jede Zelle Punkte von 0 (keine Färbung) bis 3 (starke Färbung) vergeben. Der Quotient aus der Summe der Punkte und der Gesamtzellzahl des analysierten Gesichtsfeldes ergibt den Färbeindex.

C.2.1.10 Messung des Abbaus von EZM-Proteinen durch Cathepsine

Um zu überprüfen, in welchem Maße die Cathepsine B, L und X prinzipiell in der Lage sind, EZM abzubauen, wurden fluorogene DQ-Substrate (Life Technologies, Darmstadt) mit dem jeweiligen gereinigten Cathepsin (rekombinant in *Pichia pastoris* hergestellt (Nägler et al., 1997; Nägler et al., 1999; Biniossek et al., 2011)) versetzt. Im Ursprungszustand sind diese gequenchten Substrate nicht fluoreszierend, erst im Falle einer Spaltung wird die Fluoreszenz freigesetzt. Als Substrate wurden DQ-Collagen I, DQ-Collagen IV und als Positivkontrolle DQ-BSA getestet.

Zunächst wurden die Cathepsine in Phosphatpuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT) für 5 Minuten bei RT aktiviert und dann bis zum Beginn des Experiments auf Eis gehalten. Danach wurden 10 µl Substrat mit 2 nM aktiviertem Enzym in Phosphatpuffer vermischt und die Ansätze über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Fluoreszenz im Fluorimeter gemessen ($\lambda_{\text{Excitation}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$).

C.2.2 Zellbiologische Methoden

C.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren wurden die adhärennten Zellen zunächst mittels Accutase abgelöst, gezählt und bei 500 g für 10 Minuten sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (Kulturmedium 20 % (v/v) FCS + 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in einer Konzentration von $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6/\text{ml}$ in Kryoröhrchen verteilt. Zur schonenden Abkühlung der Zellen wurden Einfrierboxen der Firma Nunc verwendet, welche im Gefrierschrank auf -80°C heruntergekühlt wurden. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen schließlich in Flüssigstickstofftanks transferiert.

Für das Auftauen der stickstoffgelagerten Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C kurz angetaut, bevor sie in 37 °C warmem Kulturmedium resuspendiert wurden. Um das noch vorhandene DMSO zu entfernen, wurden die Zellen bei 500 g sedimentiert, in frischem Medium aufgenommen und schließlich in Kulturflaschen ausgesät.

C.2.2.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Alle Zellen und Zelllinien wurden bei 37°C mit einer CO₂-Konzentration von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Für NHDF wurde das Fibroblastenmedium FGM-2 der Firma Lonza verwendet. Das Medium für MEF bestand aus DMEM mit Glutamin, 10 % (v/v) FCS und Penicillin/Streptomycin. PC-3 Zellen wurden in RPMI 1640 mit Glutamin, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) *non-essential amino acids* (PAA, Linz, Österreich) kultiviert. Alle verwendeten Zelllinien und primären Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen-Kontaminationen überprüft. Dabei wurde der Venor[®] GeM Mykoplasmen-Test von Minerva Biolabs (Berlin) verwendet.

C.2.2.3 Subkultivierung von Säugetierzellen

Zunächst wurde das Medium von subkonfluenten Kulturen abgesaugt und die Zellschicht mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine ausreichende Menge Accutase zugegeben, so dass die Zellen gerade bedeckt waren. Nach wenigen Minuten bei RT waren die Zellen von der Oberfläche abgelöst und konnten in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden. Durch Zugabe von frischem

Medium (1:1) wurde die Reaktion abgestoppt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 500 g wurden die Zellen von der Accutaselösung befreit. Nach Aufnahme in frischem Medium wurden die Zellen gezählt und in neue Kulturgefäße ausgesät.

C.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde die Zellsuspension 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,5 % (w/v) Trypanblau in PBS) versetzt, wodurch abgestorbene Zellen blau angefärbt wurden. Die Anzahl lebender Zellen wurde mikroskopisch ermittelt und deren Konzentration wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n_{\text{Zellen gesamt}}}{n_{\text{Quadrate}}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

C.2.2.5 siRNA-Transfektion von NHDF- und Prostatakarzinom-Zellen

Für die Niederregulation von Cathepsin X wurden unterschiedliche siRNAs eingesetzt. Bei der Cathepsin X-siRNA #1 handelt es sich um ein selbst-entworfenes Oligonukleotid, dessen Sequenz unter C.1.3.1.2 einsehbar ist. Cathepsin X-siRNA #2 ist eine vorgefertigte siRNA der Firma Qiagen (Hs_CTSZ_4). Als Kontrolle wurde eine unspezifische siRNA (Non-silencing) verwendet, welche ebenfalls von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen wurde.

Für die Transfektion von NHDF wurden $1,2 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) entsprechend der Angaben des Herstellers. Pro 6-Well wurden 18 µl HiPerFect und siRNAs in der Konzentration von 10 nM zugegeben. Dieser Mix wurde für 15 Stunden auf den Zellen belassen, bevor das Medium gewechselt wurde.

Die Prostatakarzinomzelllinien PC-3 sowie LNCaP wurden ebenfalls 6 Stunden vor der Zugabe des Transfektionsmixes zu 2×10^4 Zellen / cm² ausgesät. Die siRNA-Konzentration betrug auch hier 10 nM, die Menge HiPerFect pro 6-Well war 12 µl. Die Inkubationsdauer vor dem Mediumwechsel belief sich ebenfalls auf 15 Stunden.

C.2.2.6 Plasmid/siRNA-Kotransfektion von NHDF

In *Rescue*-Experimenten, in denen der Knockdown von Cathepsin X durch Insertion des Vektors pcDNA5-CatX-GFP ausgeglichen werden sollte, wurde mit siRNA #3 (Hs-CTSZ_9, Qiagen) ein drittes Oligonukleotid verwendet. Anders als die beiden anderen siRNAs, deren Erkennungsstellen innerhalb der proteinkodierenden Sequenz der mRNA liegen, bindet siRNA #3 in der 3'-UTR (untranslatierte Region) der mRNA, die nur im endogenen Transkript vorhanden

ist, jedoch nicht im Expressionsplasmid (Abb. C.3). In diesen Experimenten wurde die siRNA nicht durch Lipofektion mit HiPerFect in die Zellen eingebracht, sondern zusammen mit der Plasmid-DNA elektroporiert. Dafür wurden subkonfluente NHDF mittels Accutase abgedaut und einmal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden 6×10^5 Zellen in $400 \mu\text{l}$ *Gene Pulser Electroporation Buffer* (BIO-RAD, Hercules, USA) in eine 4 mm Elektroporationsküvette (Eurogentec, Köln) pipettiert. Zu diesem Ansatz wurden $10 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA und siRNAs in einer Konzentration von 200 nM zugefügt. Die Elektroporation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 230 V, $500 \mu\text{F}$, Kapazität ∞ . Nach diesem Vorgang wurden die Zellen auf Eis gehalten und so schnell wie möglich in frischem FGM-2 resuspendiert und auf je 3 Vertiefungen einer 6-Well-Platte verteilt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen.



Abb. C.3: Schematische Darstellung des Rescue-Ansatzes. Prä = Präsequenz, Pro = Prosequenz, Cat X = Cathepsin X-kodierende Sequenz, UTR = untranslatierte Region

C.2.2.7 Bestimmung der Transmigrationsrate

Um die Transmigrationsrate von Zellen zu überprüfen, wurden Invasionsversuche mit Hilfe der Boyden-Kammer durchgeführt. Eine Boyden-Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine poröse Membran getrennt sind. Dabei befindet sich in der oberen Kammer Minimalmedium, während die untere Kammer ein serumhaltiges Medium enthält, sodass sich über die Membran ein Chemogradient aufbaut. Je nach Bedarf wird die Membran mit verschiedenen EZM-Proteinen beschichtet. Die Zellen werden in Minimalmedium auf diese beschichtete Membran pipettiert und wandern dann entsprechend des Gradienten durch die Membranporen in Richtung unterer Kammer und werden schließlich gezählt.

Für unsere Experimente wurde eine Boyden-Platte (24-Well, Porengröße $8 \mu\text{m}$, 12 Einsätze; Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) mit $10 \mu\text{g}$ Substrat (humane EZM, einzelne EZM-Proteine oder Matrigel) pro Einsatz beschichtet. Dazu wurde das Substrat in Serum-freiem Medium auf eine Endkonzentration von $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt und jeweils $200 \mu\text{l}$ in einen Einsatz gegeben. Die Platte wurde unter der Sterilbank über Nacht mit geöffnetem Deckel getrocknet. Vor Beginn des Versuches wurde die eingetrocknete Matrix in je $200 \mu\text{l}$ Serum-freiem Medium für 2 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ rekonstituiert. Währenddessen wurden die Zellen mit Accutase abgedaut, abzentrifugiert (500 g , 10 min) und in serumfreiem Medium + 1% (v/v) Nutridoma (Roche, Mannheim) aufgenommen und gezählt. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurden die Zellen durch Zugabe der entsprechenden Volumina an DMEM + 1% (v/v) Nutridoma auf die gewünschte Konzentration eingestellt. In die Transwell-Einsätze wurden je $200 \mu\text{l}$ Zellsuspension in Triplikaten pipettiert, was bei Fibroblasten 20.000 Zellen und bei PC-3-Zellen 40.000 Zellen

entsprach. In die Vertiefungen ohne Einsätze wurde jeweils 600 µl serumfreies Medium + 1 % (v/v) Nutridoma + 10 % (v/v) humanes Serum pipettiert. Bei Experimenten mit IGFs als Lockstoff wurde auf Nutridoma verzichtet. Die Konzentration entsprach in diesem Fall für IGF-I 50 ng/ml und für IGF-II 200 ng/ml. Anschließend wurde die Platte für 45 Minuten im Brutschrank belassen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Einsätze luftblasenfrei in die Vertiefungen mit dem Serum- oder IGF-haltigen Medium gesetzt. Die nun folgende Invasionsdauer im Brutschrank belief sich für NHDF und PC-3-Zellen auf 18 Stunden, für MEF auf 6 Stunden. Anschließend wurde das Medium komplett abgesaugt und nicht-migrierte Zellen auf der Oberseite der Membranen mit Hilfe von Wattestäbchen entfernt und mit PBS gewaschen. Die verbleibenden Zellen auf der Unterseite wurden durch Zugabe von je 800 µl eiskaltem Methanol und eine 10-minütige Inkubation bei 4 °C fixiert. Nun wurde der Methanol durch je 800 µl PBS + 0,2 % (v/v) Triton-X-100 ersetzt und für 10 Minuten inkubiert, um die Zellen für die folgende DAPI-Färbung zu permeabilisieren. Nach Entfernen der Permeabilisierungslösung wurden je 600 µl Färbelösung (PBS + DAPI, 1:7500) in die Vertiefungen gegeben und die Platte für 3 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein 3-maliges Waschen mit PBS. Schließlich wurden je Kavität 1,6 ml PBS pipettiert und die Platten mittels Epifluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dazu wurden mit einem 4-fach-Objektiv je Einsatz 4-5 Gesichtsfelder fotografiert (SensiCam QE; PCO AG, Kehlheim) und die fluoreszierenden Kerne automatisch mit der ImageProPlus-Software ausgezählt.

C.2.2.7 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Färbungen wurden nach dem Protokoll von Prof. Dr. Klaudia Brix (Jacobs-Universität Bremen) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert, um eine Partikelbildung auf dem Präparat zu vermeiden. Zunächst wurde eine PFA-Stocklösung (16 % (w/v) Paraformaldehyd) für die Fixierung der Zellen vorbereitet. Dazu wurden 16 g PFA in 60 ml dH₂O unter Rühren auf 60 °C im Wasserbad erhitzt. Es folgte eine tropfenweise Zugabe von 1 N NaOH, bis das PFA vollständig in Lösung übergegangen war. Anschließend wurde die Lösung auf 100 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Für die Immunfärbung wurden PC-3-Zellen am zweiten Tag nach Transfektion in *Chamber Slides* (4-fach, BD Biosciences, Bedford, USA) zu 40.000 Zellen je Kammer ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Wachstumsmedium nach 3-maligem Waschen mit PBS durch serumfreies RPMI ersetzt und die Zellen darin für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde IGF-I in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugegeben und die Zellen für 20 Minuten stimuliert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 8 % PFA/200 mM Hepes, pH 7,4 für 30 Minuten bei RT fixiert. Es folgten Waschschrte mit 200 mM Hepes (3 x 10 Minuten) und PBS (1 x 5 Minuten). Durch eine 2-minütige Inkubation mit 0,2 % (v/v) Triton-X-100 wurden die Zellen permeabilisiert und anschließend noch 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Blockieren wurde PBS + 3 % (w/v) BSA für 30 Minuten bei 37 °C eingesetzt. Es folgten 3 Waschschrte mit 0,1 % (w/v) BSA in PBS für je 10 Minuten. Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dazu

wurde der Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (s. Tabelle C.3) in 0,1 % BSA/PBS gelöst. Am nächsten Tag wurde der Antikörper durch 3-maliges Waschen mit 0,1 % BSA/PBS für je 10 Minuten entfernt. Als nächstes wurden die Präparate mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei RT inkubiert, wobei auch dieser in 0,1 % BSA/PBS verdünnt war (1:200). Die Zellen wurden erneut gewaschen, zunächst 3 x 5 Minuten mit PBS und anschließend 3 x 2 Minuten in dH₂O. Schließlich wurden die Präparate in Prolong Gold (Life Technologies, Darmstadt) eingebettet und mikroskopisch ausgewertet.

Tabelle C.3: Verdünnungen der in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten Antikörper. Details siehe Text. Die genaue Bezeichnung und Herkunft der Antikörper sind in C.1.3.4 angegeben.

Antigen	Spezies	Verdünnung
IGF-IR	Kaninchen	1 : 200
phospho-IGF-IR	Kaninchen	1 : 200
phospho-FAK	Maus	1 : 200

C.2.2.8 Annexin V-Detektion zur Apoptosemessung

Für die Apoptosemessung anhand von Annexin V wurde der *FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences, Bedford, USA) verwendet. Adhärenente MEF oder NHDF (3 Tage nach Transfektion) wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten bei RT in 250 µl (je Kavität einer 6-Well-Platte) *Binding Buffer* + 12,5 µl Propidiumjodid + 12,5 µl Annexin V im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Puffer entfernt und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Mittels Accutase wurden die Zellen abgedaut und bei 500 g für 5 Minuten sedimentiert. Schließlich wurden sie in 1 ml PBS resuspendiert und im Durchflusscytometer (Beckman Coulter, Krefeld) analysiert.

C.2.2.9 Scratch Assay zur Untersuchung der Migration von Fibroblasten

Um zu überprüfen, wie gut NHDF oder MEF in der Lage sind, auf flachem Untergrund zu wandern, wurde ein sogenannter Scratch Assay durchgeführt. Dabei wird beobachtet, wie gut Zellkulturen in der Lage sind, einen Spalt definierter Größe innerhalb des Zellrasens zu schließen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 12-Well-Platten so ausgesät, dass sie am Folgetag etwa 90 % Konfluenz erreichten. Nun wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze (200 µl), die an einem Lineal entlanggeführt wurde, ein Spalt durch die Zellschicht gezogen. Die Zellen wurden nun im Brutschrank inkubiert und in festgelegten Zeitintervallen wurde eine mikroskopische Aufnahme des sich schließendes Spalts angefertigt.

C.2.2.10 Messung der Zellproliferation

C.2.2.10.1 Bestimmung der Populationsverdopplungsrate von MEF

Die einfachste Möglichkeit, die Proliferation von Zellen zu messen, besteht darin, sie direkt zu zählen. Dafür eignen sich mehrere Methoden; in unserem Fall erfolgte die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer. MEF wurden bei jedem Subkultivierungsschritt gezählt, sodass die Entwicklung der Zellzahl über die verschiedenen Passagen nachvollziehbar wurde. Die Berechnung der Populationsverdopplungen erfolgt nach folgender Formel:

$$PD = \frac{\log(N_x \div N_0)}{\log 2}$$

PD = Zahl der Verdopplungen (*population doublings*)

N_x = Zellzahl zum Zeitpunkt der Ernte

N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt der Aussaat

C.2.2.10.2 CyQUANT-Assay

Der *CyQUANT[®] NF Assay* (Life Technologies, Darmstadt) nutzt zur Bestimmung der Zellzahl ein DNA-interkalierendes Agens, dessen vorhandene Menge fluorimetrisch bestimmt wird. Es wurden 2.000 Zellen (MEF) bzw. 1.000 Zellen (NHDF) pro Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und im jeweiligen Wachstumsmedium für 6, 24 und 72 Stunden inkubiert. Nach Ausklopfen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Platten bei -70 °C gelagert, um sie schließlich gemeinsam auszuwerten. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 45 Minuten mit 0,5 mg/ml RNase A (im mitgelieferten HBSS-Puffer) behandelt, um nur die reine DNA-Menge zu messen. Anschließend wurde der in HBSS-Puffer gelöste CyQUANT NF-Farbstoff zugegeben und die Platten für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurde die Fluoreszenz mit den Werten $\lambda_{\text{Excitation}} = 485 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}} = 530 \text{ nm}$ gemessen.

C.2.2.10.3 BrdU ELISA

Als weitere Methode zur Messung der Zellproliferation wurde der Einbau von Bromodesoxyuridin (BrdU) in die DNA gemessen. Dies geschah mit Hilfe des *Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric* (Roche, Mannheim). Für diesen Test wurden 2.000 Zellen/Kavität in 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers. Die BrdU-Markierungslösung (10 µl/Kavität) wurde für 2 Stunden auf den Zellen unter Kulturbedingungen belassen und dann entfernt. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Anti-BrdU-Peroxidase-Antikörper inkubiert. Schließlich wurde die Extinktion bei 450 nm in einem ELISA-Plattenlesegerät gemessen.

C.2.2.11 Zellzyklusanalysen

C.2.2.11.1 Verteilung der Zellzyklusphasen einer Kultur

Propidiumjodid (PI) ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, mit dem man im Durchflusscytometer die jeweilige Zellzyklusphase einer Zelle bestimmen kann. Zunächst wurden Zellen aus mindestens einem Well einer 6-Well-Platte mit Accutase abgedaut und für 5 Minuten bei 700 g sedimentiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und wieder in 300 µl PBS resuspendiert. Nun wurden 700 µl Ethanol (-20 °C) unter leichtem vortexen tropfenweise zugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C, um die Zellen zu fixieren. Am nächsten Tag wurden vor dem nächsten Zentrifugationsschritt (800 g, 5 Minuten) 500 µl einer 3 %-igen BSA-Lösung in PBS zugegeben, was die Sedimentation der fixierten Zellen begünstigte. Die Zellen wurden einmal in PBS + 1 % BSA gewaschen und schließlich in 1 ml DNA-Färbelösung (PBS, 50 µg/ml PI, 2 mg/ml DNase-freie RNase A) resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT zum Abbau der RNA konnten die Proben im Durchflusscytometer analysiert werden.

Die einzelnen Zellzyklusphasen konnten entsprechend des DNA-Gehalts der Zellen bestimmt werden: Zellen in der G₁/G₀-Phase (n, einfacher Chromosomensatz), Zellen in der S-Phase (1<n<2, Verdopplung des Chromosomensatzes noch nicht abgeschlossen) und G₂/M-Phase (2n, doppelter Chromosomensatz). Zusätzlich können mit dieser Methode sowohl der Anteil toter Zellen als Sub-G1-Population (<n, fragmentierter DNA) als auch Zellaggregate (>2n) erkannt werden.

C.2.2.11.2 Bestimmung der Zellzyklusgeschwindigkeit

Um die Länge der einzelnen Zellzyklusphasen zu vergleichen, wurde ein BrdU-Pulse-Chase-Experiment durchgeführt, wie es im Wesentlichen von Wersto et al. beschrieben wurde (Wersto et al., 1998). NHDF wurden zu 100.000 Zellen/Well ausgesät und am nächsten Tag mit 100 mM BrdU (Merck, Darmstadt) für 60 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in FGM-2-Medium für bis zu 24 Stunden weiter kultiviert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch Accutase abgedaut, zweimal mit PBS gewaschen (700 g, 5 Minuten) und in eiskaltem 70 %-igem Ethanol in PBS über Nacht fixiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Inkubation in PBS + 2 M HCl + 0,5 % (v/v) Triton-X-100 für 30 Minuten bei RT, um eine Denaturierung der DNA herbeizuführen. Alle Zentrifugationsschritte der fixierten Zellen wurden auch hier unter Zusatz von 1 % BSA durchgeführt, um eine bessere Sedimentation zu erreichen. Die Proben wurden zentrifugiert (800 g, 5 Minuten) und zur Neutralisierung der Säure in 0,1 M Na₂B₄O₇, pH 8,5 resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in der BrdU-Färbelösung (PBS, 0,5 % (v/v) Tween, 1 % (w/v) BSA, 20 µl/ml anti-BrdU-FITC (BD Biosciences, Bedford, USA)) für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1 ml DNA-Färbelösung (PBS, 50 µg/ml PI, 2 mg/ml DNase-freie RNase A) für 30 Minuten bei RT inkubiert und schließlich im Durchflusscytometer (Beckman Coulter, Krefeld) analysiert.

Durch die Kombination von PI und BrdU ist es möglich, die BrdU-markierten Zellen beim Durchlaufen der verschiedenen Zellzyklusphasen zu verfolgen. Durch den kurzen BrdU-Puls werden nur Zellen in der S-Phase markiert, was sich in hohen FITC-Werten bei mittleren PI-Werten zeigt. Im Laufe der Zeit kann man nun beobachten, wie die FITC-positiven Zellen von der S-Phase in die G₂/M-Phase und schließlich wieder in die G₁-Phase eintreten. Unterschiede in der Geschwindigkeit, mit der Zellen den Zyklus durchlaufen, lassen sich so relativ gut ausmachen.

C.2.2.12 Markierung von Autophagosomen mittels Premo™ Autophagy Sensors (LC3B-GFP)

Zur Markierung der autophagischen Membranen wurden NHDF mittels der BacMam-Technologie (*insect Baculovirus with a Mammalian promoter*) mit einer fluoreszenten Form von LC3B transduziert. Die Vorgehensweise erfolgte nach Angaben des Herstellers (Life Technologies, Darmstadt). Es wurden 6×10^4 Zellen je Kavität einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 6 Stunden wurden je Well 16 μ l der LC3B-GFP-Lösung zugegeben. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Proben mikroskopisch ausgewertet werden. Zum Hungern wurde das Wachstumsmedium (FGM-2) nach einem Waschschrift mit PBS gegen DMEM ausgetauscht und die Zellen für 20 Stunden darin inkubiert, bevor sie untersucht wurden.

C.2.2.12 Markierung saurer Vesikel in NHDF-Zellen

Saure Vesikel wurden in Fibroblasten durch eine Färbung mit der fluoreszenten und acidotropen Sonde *LysoTracker® Red DND-99* nach Angaben des Herstellers markiert. Es wurden 6×10^4 Zellen pro Kavität einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Hungern wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für die angegebene Zeitdauer in DMEM kultiviert. Für die Färbung wurde das LysoTracker-Reagenz in einer Endkonzentration von 50 nM für eine Dauer von 20 Minuten zugegeben. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Proben mikroskopisch ausgewertet.

Zur Messung der LysoTracker-Fluoreszenz mit einem Durchfluscytometer wurden die Zellen geerntet und zur Regeneration anschließend für 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ in FGM-2-Medium inkubiert. Es folgte die Zugabe von LysoTracker® Red DND-99 in einer Konzentration von 50 nM. Nach 20 Minuten bei 37 °C wurden die Zellen schließlich gewaschen und für die durchfluscytometrische Analyse in PBS resuspendiert.

C.2.3 Molekularbiologische Methoden

Die meisten molekularbiologischen Methoden wurden nach Angaben von Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Abweichende Methoden und neu etablierte Techniken werden einzeln erläutert.

C.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, was sich einfach zur Konzentrationsbestimmung in einem Spektralphotometer nutzen lässt. Zu diesem Zweck wurde die Extinktion von 1,5 µl unverdünnter Nucleinsäurelösung im NanoDrop-Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 260 nm bestimmt. Die Konzentrationen wurden nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$c = OD_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \varepsilon \times d^{-1}$$

c = Nucleinsäurekonzentration in µg/ml

OD_{260} = Extinktion bei 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient

D = Schichtdicke in cm (die Absorptionswerte der NanoDrop Nucleinsäureanwendungen sind für alle Proben-teller-Messungen auf eine 1 cm lange Schichtdicke genormt)

Die allgemein akzeptierten Werte der Extinktionskoeffizienten bei Nucleinsäuren sind:

dsDNA: $\varepsilon = 50$

RNA: $\varepsilon = 40$

Verunreinigungen mit Proteinen wurden durch den Quotient $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ ermittelt. Bei einem Verhältnis von $> 1,8$ konnte von ausreichender Reinheit der Nucleinsäurelösungen ausgegangen werden.

C.2.3.2 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR wurde Gesamt-RNA aus NHDF, MEF und PC-3-Zellen isoliert. Dies geschah mit Hilfe des *RNeasy Kits* (Qiagen), der entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurde. Für einen effizienten Zellaufschluss wurde zusätzlich der *QIAshredder Kit* desselben Herstellers eingesetzt. Falls nicht direkt mit der cDNA-Synthese fortgesetzt wurde, erfolgte die Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

C.2.3.3 cDNA-Synthese

Für die Bestimmung der Transkriptmengen im RT-PCR-Experiment ist es nötig, die extrahierte RNA in cDNA umzuschreiben. Dafür wurde der *iScript cDNA Synthesis Kit* (BIO-RAD, Hercules, USA) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die jeweils eingesetzte Menge RNA entsprach 500 ng. Die Proben wurden entweder sofort per quantitativer RT-PCR analysiert oder bei -20 °C gelagert.

C.2.3.4 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Messung der mRNA-Transkripte wurde mit einem Gerät der LightCycler™-Baureihe (Roche) durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Quantifizierung von Transkripten durch die Analyse der log-Phase einer PCR, in der eine Amplifizierung des PCR-Produktes mit einer Erhöhung eines Fluoreszenzsignals einhergeht. Das Signal resultiert aus der Zunahme von dsDNA, die durch den interkalierenden Farbstoff *SYBR Green* fluoreszent wird.

Die spezifischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Search LC GmbH (zur Detektion von Cathepsinen und GAPDH) und Qiagen (für alle anderen Gene) bezogen. Die weiteren Reagenzien wurden dem *LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I*-Kit entnommen und wurden nach dem beigefügten Protokoll vorbereitet und eingesetzt. Für einen Reaktionsansatz wurden die cDNA-Proben 1:10 in RNase-freiem Wasser verdünnt und davon 5 µl verwendet. Weiterhin wurden pro Ansatz je 1 µl der Oligonukleotidlösung und des SYBR Green-Master-Mix pipettiert. Das Endvolumen von 10 µl wurde durch Auffüllen mit RNase-freiem Wasser erreicht. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe (1:10, 1:100, 1:1000) und als Negativkontrolle ein Ansatz mit Wasser mitgeführt. Die Ansätze wurden in Glaskapillaren pipettiert und bei 500 g in einer vorgekühlten Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in ein LightCycler-Kapillar-Rondell eingesetzt und die PCR-Reaktion gestartet. Für Primer von Search LC wurden folgende Bedingungen angewendet: 95 °C/10 Minuten; [95 °C/10 Sekunden → 68 °C/10 Sekunden/58 °C → 72 °C/16 Sekunden] x 35 Zyklen, Fluoreszenzverstärkung 5. Für Primer der Firma Qiagen (Hilden) wurde folgendes PCR-Programm verwendet: 95 °C/15 Minuten; [94 °C/15 Sekunden → 55 °C/30 Sekunden → 72 °C/30 Sekunden] x 40 Zyklen. In beiden Fällen wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur mit den Parametern 95°C → 58 °C/10 Sekunden dT/dt 0,1 °C/Sekunde durchgeführt. Dadurch konnten eventuell auftretende Primerdimere und unspezifische Produkte identifiziert werden.

C.2.3.5 Herstellung von Cathepsin X-Expressionsvektoren

Die kodierende Sequenz der humanen Cathepsin X-cDNA wurde mittels PCR aus einer humanen Ovarium-cDNA-Bibliothek (CLONTECH Laboratories, Heidelberg) amplifiziert, wie bereits beschrieben (Nägler and Menard, 1998). Dieses Konstrukt wurde mittels der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in die *HindIII* und *XhoI* Spaltstellen des Vektors pcDNA5/FRT/TO (Life

Technologies, Darmstadt) ligiert. Die anschließende initiale Selektion adäquater Klone wurde mit One Shot TOP10 chemisch kompetenten Zellen durchgeführt.

C.2.3.6 Transformation von *E. coli*

Verwendet wurden XL10-Gold® ultrakompetente Zellen (Stratagene, La Jolla, USA), die nach Angaben des Herstellers transformiert wurden. Dazu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und je Ansatz 100 µl davon in ein 14 ml Polypropylen-Röhrchen transferiert. Nach Zugabe von 4 µl β-Mercaptoethanol je Zellaliquot wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert, wobei sie alle 2 Minuten aufgeschüttelt wurden. Nun wurden jeweils 10 ng Plasmid-DNA zugegeben und die Ansätze für weitere 30 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Röhrchen für 30 Sekunden in einem 42 °C warmen Wasserbad erwärmt, bevor sie für 2 Minuten erneut auf Eis gestellt wurden. Es wurden 0,9 ml vorgewärmtes (42 °C) NZY+-Medium zugegeben und die Ansätze für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

C.2.3.7 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Transformierte *E. coli* wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Ampicillin-Medium (50 µg Ampicillin pro ml) geschüttelt, bis sie eine Dichte von ca. $3-4 \times 10^9$ Zellen pro ml erreicht hatten. Die Isolierung erfolgte nach den Protokollen der Fertigungskits von Qiagen für Mini- und Midipräparationen. Die DNA-Pellets wurden schließlich in TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

C.2.3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde ermittelt, indem die Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit dem Student's T-Test (bei 2 zu vergleichenden Gruppen) bzw. der Varianzanalyse ANOVA (bei 3 oder mehr Gruppen) miteinander verglichen wurden. Als statistisch signifikant wurden P-Werte angesehen, die kleiner als 0,05 (*), 0,01(**) bzw. 0,001 (***) waren. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

D Ergebnisse

D.1 Cathepsin X-Defizienz in verschiedenen zellulären Systemen

D.1.1 NHDF als Modellsystem

Die Untersuchungen zur Beteiligung von Cathepsin X an Invasions-/Migrations-Prozessen erfolgten zunächst an primären humanen Fibroblasten. Dazu kamen normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) zum Einsatz, in welchen mittels RNA-Interferenz (RNAi) ein transienter Knockdown von Cathepsin X induziert wurde.

Die Transfektionseffizienz wurde mit einer fluoreszierenden Non-silencing-siRNA bestimmt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei Verwendung des Transfektionsmittels HiPerFect annähernd jede Zelle fluoreszierende Vesikel enthält (Abb. D.1). Zusätzlich zu den intrazellulären Fluoreszenzsignalen sind auch außerhalb der Zelle kleine fluoreszierende Vesikel zu sehen, welche offensichtlich nicht endozytierte Komplexe aus siRNA und Transfektionsreagenz darstellen.

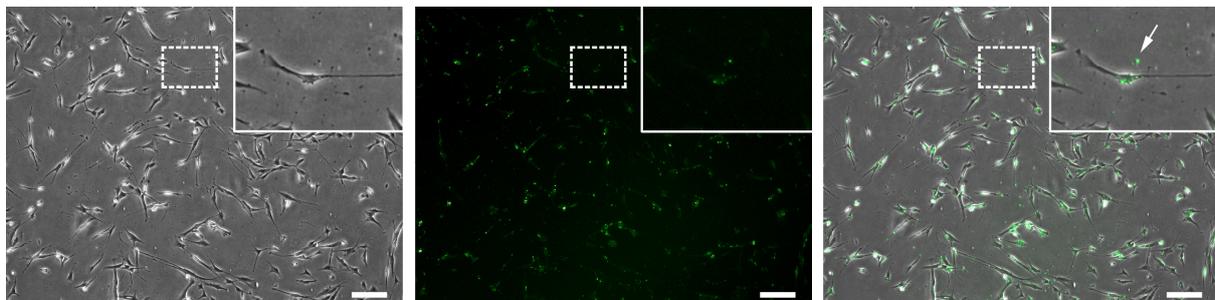


Abb. D.1: NHDF nach Transfektion mit einer fluoreszierenden siRNA. NHDF wurden mit einer Non-silencing-siRNA transfiziert, an die der Farbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt ist. Die Aufnahmen wurden 24 Stunden nach Transfektion erstellt. Die eingesetzte siRNA-Konzentration entsprach dabei der in den später durchgeführten Knockdown-Experimenten eingesetzten Konzentration. Die Transfektionseffizienz liegt mit dieser siRNA bei annähernd 100 %. Fluoreszente Partikel kommen teilweise auch außerhalb der Zellen vor (Pfeil). Linke Seite: Phasenkontrast-Aufnahme. Mitte: Fluoreszenz-Aufnahme. Rechte Seite: Überlagerung. Der Größenstandard entspricht 200 μm .

Im nächsten Schritt wurde eine Cathepsin X-spezifische siRNA eingesetzt und die Knockdown-Effizienz über einen Zeitraum von 5 Tagen verfolgt. Mittels quantitativer RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass nach 24 Stunden Effizienzen von über 90 % Downregulation erreicht (Abb. D.2A) wurden. Innerhalb der nächsten Tage stieg die Menge der Cathepsin X mRNA leicht an, die Downregulation nach 120 Stunden betrug dennoch weiterhin knapp 80 % im Vergleich zur Kontrolle. Auf Proteinebene war nach 24 Stunden dagegen zunächst ein relativ geringer Effekt zu erkennen (D.2B & C), der möglicherweise auf die längere Halbwertszeit von Proteinen im Vergleich zu mRNA zurückzuführen ist. Nach 3 Tagen konnten die Cathepsin X-

Proteinmengen der Zellysate um über 80 % reduziert werden, wie die ELISA- und Immunoblot-Daten belegen. Dieser Wert konnte bis einschließlich Tag 5 annähernd konstant gehalten werden. Auch im Zellkulturüberstand konnte über diesen Zeitraum eine dauerhafte Reduktion der sezernierten Proteinmenge erzielt werden (D.2D). Hier stieg die Cathepsin X-Proteinmenge der Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 72 Stunden leicht an, um dann wieder abzufallen. Da die Konzentrationen an Cathepsin X-Protein im Überstand zu gering waren, um sie im Immunoblot nachzuweisen, liegen hier ausschließlich ELISA-Daten vor.

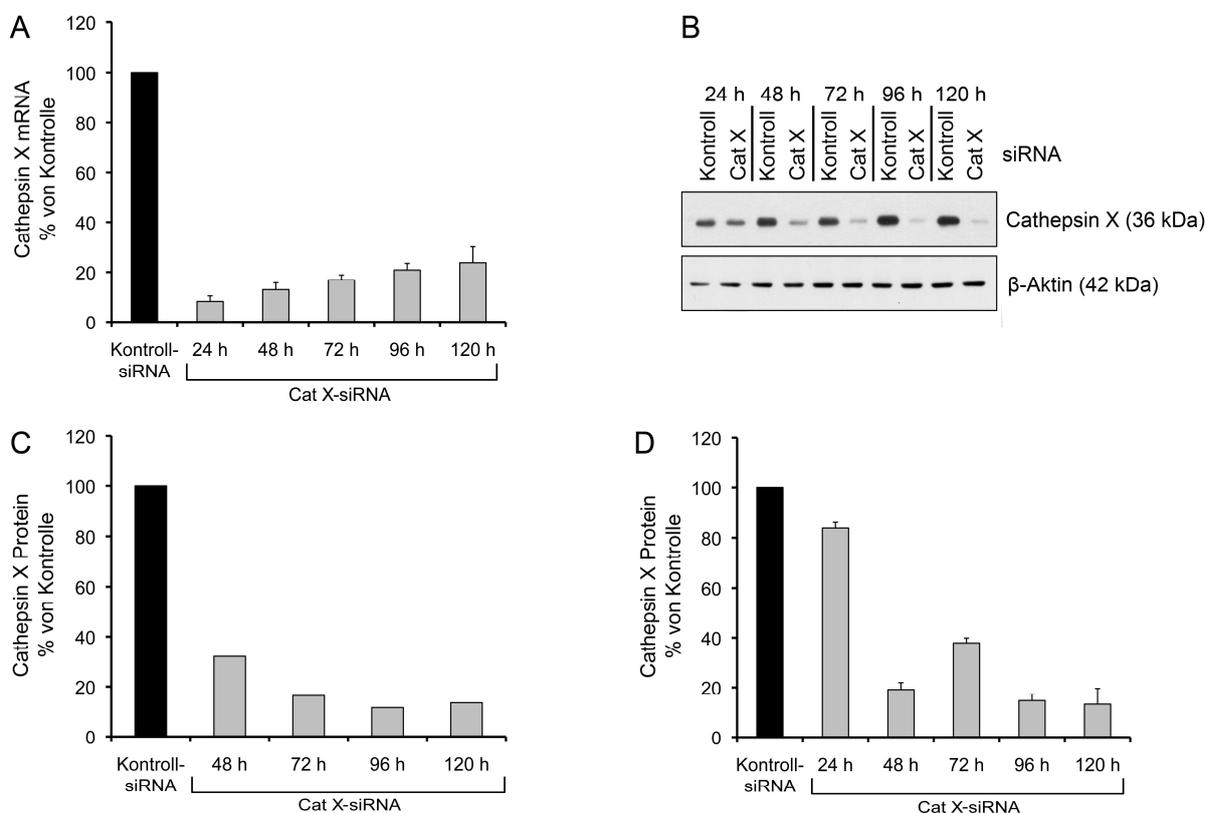


Abb. D.2: Effizienz des Cathepsin X-Knockdowns in NHDF. (A) Die Cathepsin X-mRNA-Mengen wurden mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und auf GAPDH normiert. Die Messwerte für Kontrollzellen wurden auf 100 % festgelegt. Die maximale Knockdown-Effizienz von über 90 % ist bereits nach 24 Stunden erreicht und steigt in den folgenden Tagen sukzessive an. (B) Kontrolle des Knockdowns auf Proteinebene im Immunoblot. Hier zeigt sich aufgrund der längeren Halbwertszeit des Proteins die größte Differenz im Vergleich zur Kontrolle erst nach 96 Stunden. (C) Die Analyse der Proteinmenge von Cathepsin X mittels ELISA ist praktisch deckungsgleich mit den Immunoblot-Ergebnissen. Auch hier ergibt sich die maximale Knockdown-Effizienz nach 96 Stunden. (D) Die Cathepsin X-Proteinmengen in den Zellkulturüberständen wurden ebenfalls mittels ELISA gemessen. Die Säulen entsprechen Mittelwerten \pm SD von Triplikationsansätzen.

Da zwischen den verschiedenen Cathepsinen eine gewisse Redundanz hinsichtlich deren Funktion und Aufgaben herrscht, sollte weiterhin untersucht werden, ob das Ausschalten von Cathepsin X die Expression der Cathepsine B und L beeinflusst. Dabei war zu beobachten, dass die Cathepsin X-Defizienz bei NHDF zu einer kompensatorischen Heraufregulation der mRNAs für Cathepsin B und L führt (Abb. D.3). Die Menge an Cathepsin B mRNA betrug ca. 175 %, für Cathepsin L ca. 700 % relativ zur Kontrolle.

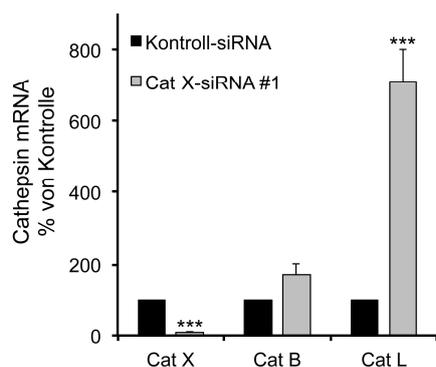


Abb. D.3: Einfluss des Cathepsin X-Knockdowns auf die Expression der Cathepsine B und L. Der Verlust von Cathepsin X führt zu einem leichten kompensatorischen Anstieg der mRNA für Cathepsin B. Für die Cathepsin L-mRNA wurde eine 7-fache Heraufregulation gemessen.

Eine wichtige Kontrolle bei siRNA-Versuchen ist die Durchführung eines *Rescue*-Experiments. Dabei soll der ursprüngliche Phänotyp durch Expression einer siRNA-resistenten Form des betroffenen Gens wiederhergestellt werden. Durch derartiges Vorgehen kann sichergestellt werden, dass keine experimentellen Artefakte vorliegen und die beobachteten Effekte nach Knockdown spezifisch dem jeweiligen Gen zuzuordnen sind.

Um *Rescue*-Experimente für den siRNA-vermittelten Knockdown von Cathepsin X durchzuführen, wurde zusätzlich zur Cathepsin X-spezifischen siRNA ein Cathepsin X-Expressionsvektor durch Elektroporation in die Zellen eingeführt, der für ein Cathepsin X-GFP-Fusionskonstrukt codiert. Zur Überprüfung der Expression des exogenen Konstrukts wurde 2 Tage nach Transfektion die Cathepsin X-mRNA-Menge mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Die Cathepsin X-siRNA in Kombination mit dem leeren Kontrollvektor führte auch nach Elektroporation zu einer Knockdown-Effizienz von über 90 % (Abb. D.4A), was vergleichbar ist mit den bei der Lipofektion erzielten Ergebnissen. Der Cathepsin X-Expressionsvektor konnte zusammen mit der Kontroll-siRNA überraschenderweise lediglich eine Steigerung der Transkriptmenge auf etwas mehr als das 3-fache herbeiführen. Durch die in der 3'-UTR-bindende Cathepsin X-siRNA #3 wurde diese Erhöhung der Cathepsin X-Expression allerdings erwartungsgemäß kaum beeinflusst, sodass der *Rescue* mit dieser Kombination auf RNA-Ebene als erfolgreich anzusehen ist. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch auf Proteinebene erzielen. Durch den GFP-Tag des Konstrukts auf dem Vektor lässt sich zudem endogenes von exogenem Cathepsin X sehr gut unterscheiden. So konnten wir mit Cathepsin X-siRNA #3 an Tag 3 nach Transfektion eine Reduktion des endogenen Proteins um etwa 50 % beobachten (Abb. D.4B). Die Menge des exogenen Cathepsin X-GFP entspricht ca. 50 % der in den Kontrollen vorhanden Cathepsin X-Menge und wird, im Einklang mit den theoretischen Überlegungen, nicht durch die siRNA beeinflusst. Dies bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt die Bedingungen des *Rescue*-Experiments zu vergleichbaren Cathepsin X-Gesamtproteinmengen wie in den Kontrollzellen (leerer Vektor + Kontroll-siRNA) führen, was für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den darauffolgenden Studien von entscheidender Bedeutung ist. Nur so lassen sich die Effekte der siRNA-Oligonukleotide von den Auswirkungen unterschiedlich hoher Cathepsin X-Konzentrationen innerhalb der Zelle tatsächlich trennen.

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, im Zeitraum von 3-5 Tagen nach Transfektion durchgeführt.

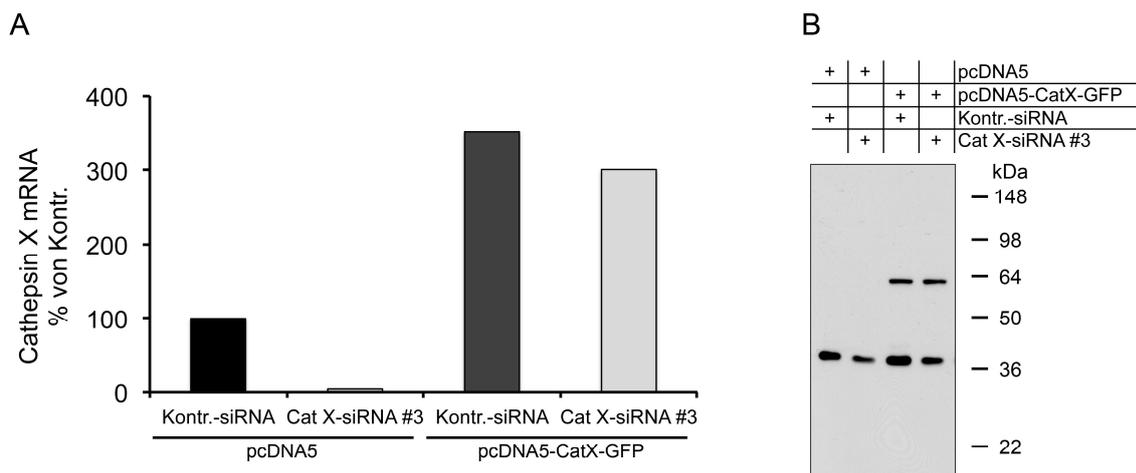


Abb. D.4: Überprüfung der Cathepsin X-Überexpression auf RNA- und Proteinebene: (A) Während die Cathepsin X-siRNA #3 in Verbindung mit dem leeren Vektor zu einem deutlichen Knockdown führt, bleibt die erhöhte Expression des Cathepsin X-Expressionsvektors erhalten. (B) Immunoblot der Zellysate der verschiedenen Kombinationen aus Vektor und siRNA für *Rescue*-Experimente. Die siRNA vermindert ausschließlich endogenes Cathepsin X (ca. 36 kDa), wohingegen das exogene GFP-Fusionsprodukt nicht beeinflusst wird.

D.1.2 MEF als Modellsystem

Um sicherzustellen, dass die zellulären Veränderungen unabhängig von der Spezies und der angewandten Methode zur Generierung einer Cathepsin X-Defizienz sind, wurden neben NHDF auch murine embryonale Fibroblasten (MEF) aus Cathepsin X^{-/-}-Mäusen untersucht. Zur Bestätigung des Cathepsin X-Knockouts wurde die Cathepsin-mRNA-Menge mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. D.5A). Erwartungsgemäß konnte in den Cathepsin X^{-/-}-Fibroblasten keine Cathepsin X-Expression detektiert werden. Um den Knockout von Cathepsin X auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Lysate von Wildtyp- und Knockout-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Cathepsin X mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot detektiert. In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten konnte in den Proben der Knockout-Zellen kein Cathepsin X-Protein nachgewiesen werden (Abb. D.5B).

Ähnlich wie bei NHDF führte der Cathepsin X-Knockout in MEF zu einer kompensatorischen Erhöhung der mRNA-Mengen von Cathepsin B und L im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. D.5A). Wie schon bei NHDF wurde für Cathepsin L eine deutlichere Steigerung der Expression gefunden als bei Cathepsin B. In Relation zu den humanen Fibroblasten fällt die Zunahme an Cathepsin B- und Cathepsin L-mRNA jedoch geringer aus.

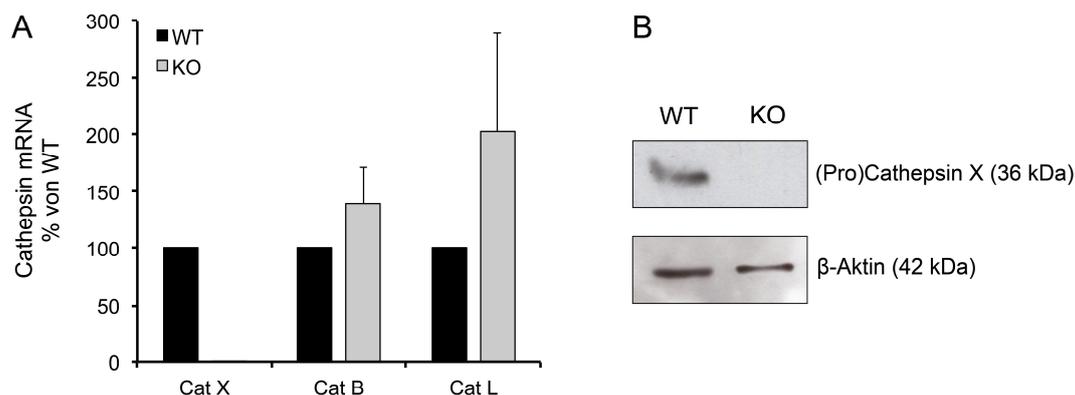


Abb. D.5: Cathepsin X-mRNA und -Protein in MEF. (A) Mittels quantitativer RT-PCR wurde Cathepsin-mRNA bestimmt. Erwartungsgemäß ist in den Knockout-Zellen kein Cathepsin X zu detektieren. Vergleichbar mit NHDF wird im Gegenzug Cathepsin B leicht und Cathepsin L etwas stärker heraufreguliert. (B) Cathepsin X-Detektion in MEF-Zelllysaten. Der Knockout konnte auf Proteinebene ebenfalls bestätigt werden.

D.1.3 Prostatakarzinomzellen PC-3 als Modellsystem

Zusätzlich wurden auch die beiden Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3 und LNCaP verwendet, um zu überprüfen, ob sich auch transformierte Zellen unter Cathepsin X-Defizienz vergleichbar verhalten wie die oben beschriebenen primären Fibroblasten.

Die Linie PC-3 entstammt einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms und besitzt eine sehr hohe Invasivität. Wie auch bei den untransformierten Fibroblasten, handelt es sich bei dieser Zelllinie um adhärent wachsende Zellen, die im Wesentlichen auch ähnlich behandelt wurden.

So wurde auch bei den PC-3-Tumorzellen ein siRNA-vermittelter Knockdown von Cathepsin X induziert, welcher über einen Zeitraum von 5 Tagen überwacht wurde (Abb. D.6). Auch in diesem Fall war eine Lipofektion mittels HiPerFect das Mittel der Wahl. Nach 24 Stunden konnte bereits eine Knockdown-Effizienz von etwa 82 % erreicht werden, die über den gesamten Zeitraum von 5 Tagen auf mindestens diesem Niveau stabil gehalten werden konnte. Auf Proteinebene setzten die Effekte etwas verzögert ein. Hier waren die Cathepsin X-Proteinmengen an Tag 3 und 4 am niedrigsten, weshalb alle Experimente im Zeitraum von 3-5 Tagen nach Transfektion durchgeführt wurden.

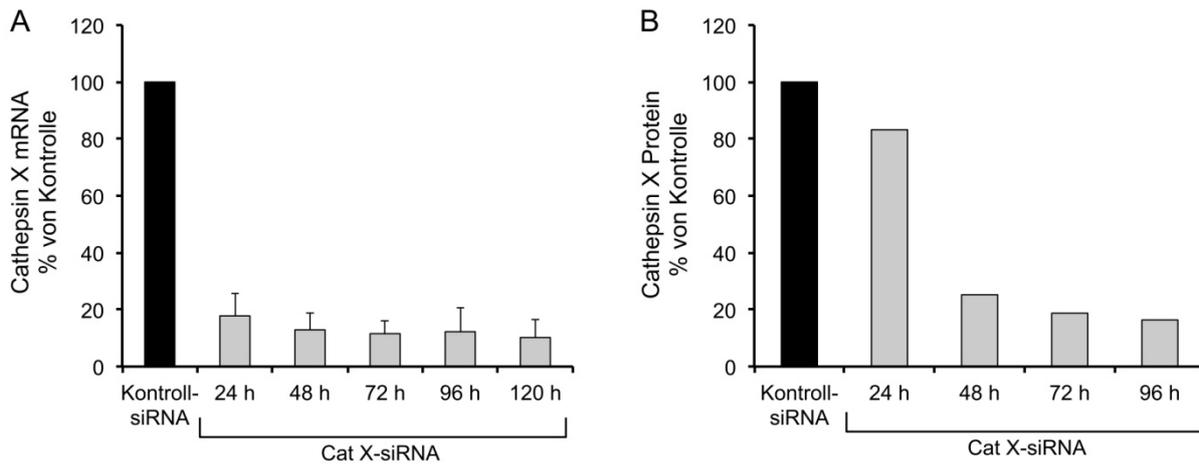


Abb. D.6: Cathepsin X Knockdown-Effizienz in PC-3 Zellen. (A) Quantifizierung der Cathepsin X-mRNA-Menge nach siRNA-Transfektion (auf GAPDH normiert). Die maximale Knockdown-Effizienz von ca. 85 % ist bereits nach 48 h erreicht und bleibt bis zu Tag 5 stabil. (B) Die Cathepsin X-Protein-Mengen wurde mittels ELISA bestimmt. Nach 72 Stunden beträgt die Effizienz über 80 % und steigt bis 96 Stunden nach Transfektion nicht wieder an. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SD aus Experimenten mit Triplikaten.

D.1.4 Prostatakarzinomzellen LNCaP als Modellsystem

Als weitere Tumorzelllinie neben PC-3 wurden zu Vergleichszwecken auch die ebenfalls adhärent wachsenden LNCaP-Zellen analysiert. LNCaP-Zellen wurden ursprünglich aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase gewonnen. Im Vergleich zur Linie PC-3 ist die Invasivität von LNCaP-Zellen deutlich weniger ausgeprägt.

Da diese Zelllinie eingesetzt wurde, um die mit PC-3-Zellen gewonnenen Ergebnisse von lediglich einigen ausgewählten Experimenten in einem weiteren transformierten Zelltyp zu bestätigen, wurde hier auf eine Zeitkinetik des Knockdowns verzichtet. Der siRNA-induzierte Knockdown von Cathepsin X wurde nach 3 Tagen (zum Zeitpunkt der Experimente) mittels qRT-PCR auf RNA-Ebene (Abb. D.7 A) und auf Proteinebene per Immunoblot (Abb. D.7 B) kontrolliert. Mit einer Cathepsin X-mRNA-Restmenge von unter 15 % ist die Knockdown-Effizienz vergleichbar mit der in PC-3-Zellen. Die Knockdown-Daten auf Proteinebene stimmen zum gleichen Zeitpunkt gut mit den mRNA-Daten überein: Auch im Immunoblot der Zelllysate ist Cathepsin X nach 3 Tagen nur noch in deutlich reduzierter Menge vorhanden.

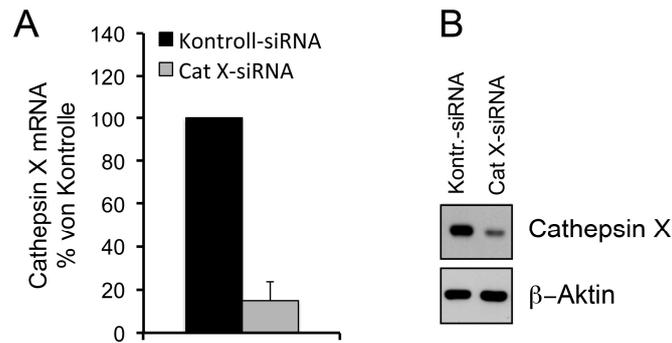


Abb. D.7: Kontrolle des Cathepsin X-Knockdown in LNCaP-Zellen. (A) Quantifizierung der Cathepsin X-mRNA-Menge mittels quantitativer RT-PCR nach Normierung auf GAPDH. Die Cathepsin X-siRNA bewirkt nach 3 Tagen eine Reduktion der entsprechenden mRNA-Menge um $85,47 \pm 8,73$ %. (B) Immunoblot von LNCaP-Zellysaten zur Bestätigung des Cathepsin X-Knockdown auf Proteinebene 3 Tage nach Transfektion.

D.2 Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die Invasions- und Migrationsfähigkeit von Fibroblasten

D.2.1 Transmigration Cathepsin X-defizienter Fibroblasten

Cathepsin X wird in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert und sezerniert. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die erhöhte Cathepsin X-Produktion zur Unterstützung von Invasionsprozessen führen könnte. Darauf weist auch eine Studie mit einer Magenkarzinomzelllinie hin, deren Invasionsfähigkeit nach einem Knockdown von Cathepsin X deutlich reduziert war (Krueger et al., 2005). Zunächst sollte getestet werden, ob Ähnliches auch für nicht-transformierte Zellen gilt. Zur Bestimmung des Invasionspotentials von NHDF-Zellen unter dem Einfluss der Cathepsin X-Defizienz wurden Transwell-Experimente in der Boyden-Kammer durchgeführt. Dabei folgen die Zellen dem Chemogradienten zwischen den beiden Kammern, überwinden die poröse Membran, die mit Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) beschichtet ist, und werden schließlich gezählt. Neben der reinen Migration über die poröse Membran hinweg wird bei derartigen Experimenten vor allem das Invasionspotential der Zellen gemessen, das in erheblichem Maße auch von der Fähigkeit zur Spaltung von EZM-Substraten abhängt.

Die Ergebnisse, die wir mit den primären Fibroblasten erhielten, bestätigten unsere Erwartungen: Bei Cathepsin X-siRNA-behandelten NHDF zeigte sich eine Reduktion der Invasionsfähigkeit um mind. 30 % unter Verwendung einer Beschichtung aus humaner EZM (Abb. D.8A). Je nach verwendeter siRNA verminderte sich die Invasion sogar um bis zu 50 %.

Auch bei Fibroblasten murinen Ursprungs (MEF) führte der Verlust von Cathepsin X zu einer verminderten Transmigration. Es stellte sich heraus, dass bei diesen primären Zellen eine Passagenabhängigkeit hinsichtlich der Invasionsfähigkeit besteht. Je höher die Passage der Zellen, desto deutlicher traten die Unterschiede zwischen Cathepsin X-Knockout und Wildtyp-Zellen hervor. Neben humaner EZM wurden auch Matrigel als murine Alternative zur humanen EZM sowie Fibronectin und Vitronectin als Substrate eingesetzt. Unabhängig von der verwendeten Beschichtung war die Transmigration von Cathepsin X-defizienten Zellen eingeschränkt. Weiterhin traten die Unterschiede in der Invasionsfähigkeit bei allen Beschichtungssubstraten umso deutlicher hervor, je höher die Passage der getesteten Zellen war (Abb. D.8B).

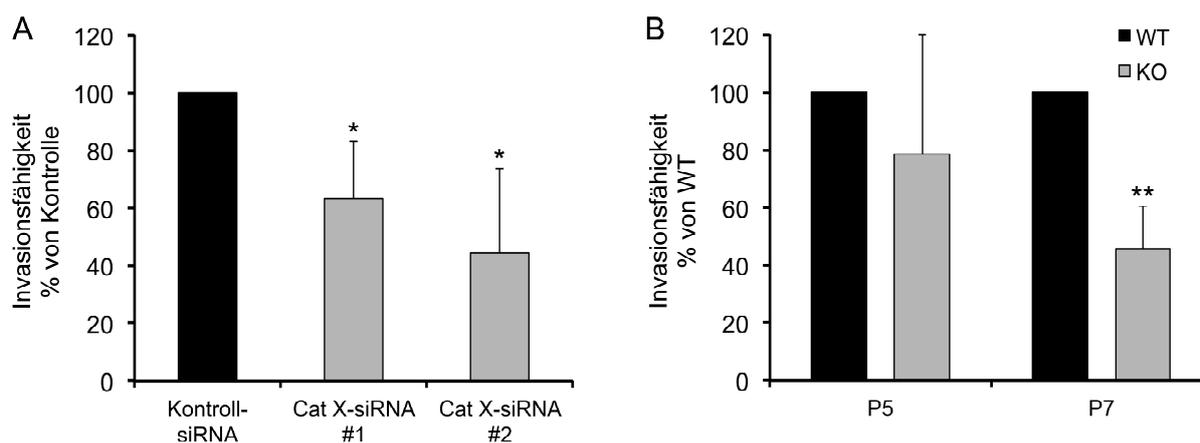


Abb. D.8: Transmigration humaner und muriner Fibroblasten. (A) Invasion von NHDF drei Tage nach Transfektion. Beide Cathepsin X-siRNAs führten zu einer signifikant verringerten Invasion durch die mit humaner EZM beschichtete Transwellmembran. (B) Invasion von MEF. Die Membranen wurden mit humaner EZM, Matrigel, Fibronectin oder Vitronectin beschichtet. Die Zellen befanden sich entweder in Passage 5 (P5) oder Passage 7 (P7). Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus Experimenten mit allen 4 Beschichtungen (NHDF: nur EZM).

D.2.2 Migration Cathepsin X-defizienter Fibroblasten

Im Scratch Assay oder Wundheilungsversuch wird die reine Migrationsfähigkeit von Zellen auf einem flachen Untergrund untersucht. Anders als bei Transwell-Versuchen in der Boyden-Kammer ist hier nur die Motilität der Zellen ausschlaggebend, Einflüsse durch Proteolyse, welche bei der Invasion sehr entscheidend ist, sind bei diesem Versuchsaufbau nicht zu erwarten. Beachtet werden sollte allerdings, dass bei zunehmender Versuchsdauer auch die Zellproliferation einen nicht zu vernachlässigenden Faktor darstellt, durch den das Ergebnis mit beeinflusst wird. Bestimmt wird bei diesem Experiment die Zeit, die die Zellen benötigen, um einen Spalt definierter Breite zu schließen. Mit einer Pipettenspitze wurde auf dem Zellrasen eine Furche von ca. 1 mm Durchmesser erzeugt und die Kulturen über 120 Stunden bzw. 48 Stunden beobachtet, bis sich bei den Kontrollzellen die „Wunde“ durch eingewanderte Zellen wieder geschlossen hat (Abb. D.9).

A

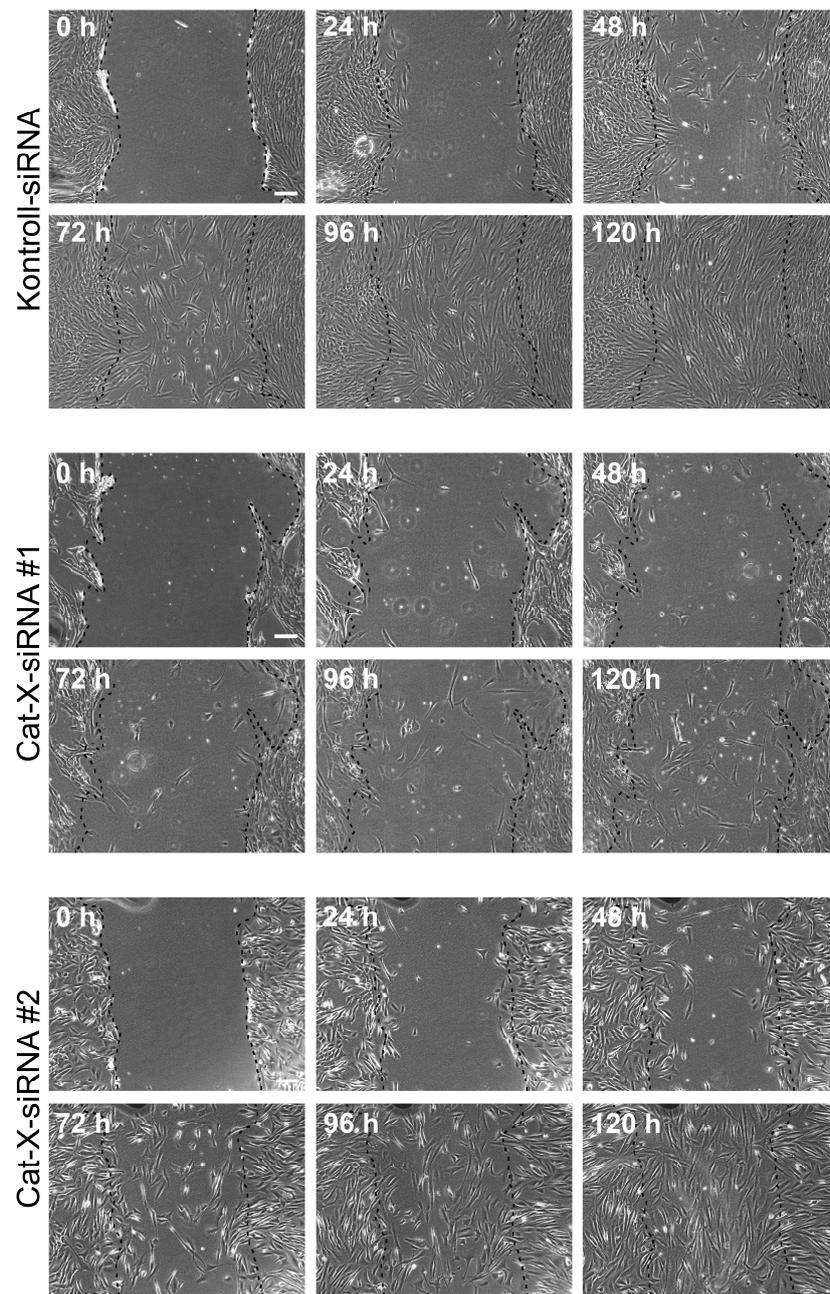
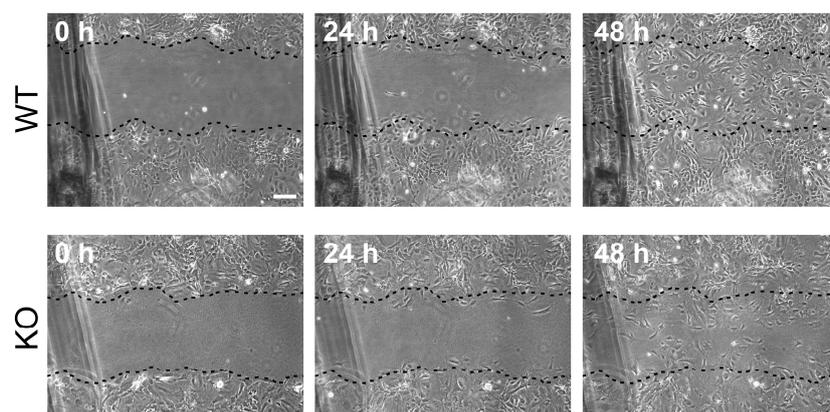


Abb. D.9: Scratch Assay mit NHDF und MEF. (A) Migration von NHDF. Nach etwa 120 Stunden hat sich bei der Kontrolle wieder ein geschlossener Zellrasen ausgebildet. Im Vergleich nimmt dieser Vorgang sowohl bei Cathepsin X-siRNA #1 als auch #2 mehr Zeit in Anspruch. (B) Migration von MEF. Die Dauer bis zum Verschluss der Spalts ist bei Cathepsin X^{-/-}-Zellen erhöht. Die gestrichelte Linie markiert jeweils die Grenzen des Spalts zu Beginn des Experiments. WT = Wildtyp, KO = Cathepsin X-Knockout. Der Größenstandard entspricht 200 μm

B



Da nach unserer Hypothese das Fehlen von Cathepsin X keine große Relevanz für die Fähigkeit zur Spaltung von EZM hat, erwarteten wir beim Scratch Assay, der ja im Gegensatz zum Transwell-Experiment unabhängig von proteolytischem EZM-Abbau ist, ebenfalls eine verringerte Mobilität Cathepsin X-defizienter Fibroblasten zu beobachten.

Wie die vorangegangenen Transwell-Ergebnisse bereits vermuten ließen, war die Zeit bis zum vollständigen Schließen des Spalts in NHDF-Kulturen nach Cathepsin X-Knockdown tatsächlich erhöht. Während in der Kontrolle der Spalt bereits nach 4 Tagen komplett geschlossen war, konnte dies bei Cathepsin X-defizienten Zellen, abhängig von der eingesetzten siRNA, frühestens nach 5 Tagen beobachtet werden (Abb. D.9A).

Ganz ähnlich verhielt es sich mit den murinen Fibroblasten. Diese bewegen sich jedoch schneller auf dem Untergrund, weshalb der Beobachtungszeitraum hier auf 48 Stunden begrenzt wurde. Die Regeneration war bei Wildtyp-Zellen bereits nach 48 Stunden annähernd abgeschlossen, wohingegen die Läsion bei Cathepsin X^{-/-}-MEF nach dieser Zeit noch deutlich sichtbar war (Abb. D.9B).

D.2.3 Degradation von EZM-Substraten durch die Cathepsine B, L und X

Wie wir zeigen konnten, führt die Downregulation von Cathepsin X zu einer verminderten Invasion von Fibroblasten in der Boyden-Kammer. Aufgrund der fehlenden endoproteolytischen Aktivität von Cathepsin X vermuteten wir, dass diese Protease die zelluläre Invasion nicht durch die Spaltung von EZM-Komponenten unterstützen kann. Vielmehr schienen hier andere, bisher noch nicht bekannte Mechanismen eine Rolle zu spielen. Der folgende Versuch sollte nun die mangelnde Fähigkeit von Cathepsin X, EZM-Komponenten in relevanten Mengen abzubauen, bestätigen. Dazu wurde untersucht, ob Cathepsin X in der Lage ist, gequenchte fluorogene Substrate zu spalten, deren Fluoreszenz anschließend gemessen wurde. Zum Vergleich wurden auch die Cathepsine B und L mitgeführt, die unterschiedlich starke endoproteolytische Aktivitäten aufweisen. Als Substrate wurden DQTM-Kollagen I, DQTM-Kollagen IV, sowie als Positivkontrolle das leicht zu spaltende DQTM-BSA (Bovines Serumalbumin), getestet. Wie erwartet, wurden alle drei Substrate von Cathepsin L sehr gut degradiert, wobei sich zeigte, dass BSA um ein vielfaches besser abgebaut wurde als die beiden Kollagene (Abb. D.10). Im Vergleich zu Cathepsin L zeigten bereits die Ansätze mit Cathepsin B einen erheblich reduzierten Abbau der Proteine. Die gemessene Fluoreszenz in den Ansätzen mit Cathepsin X war relativ zu Cathepsin B nochmals deutlich abgeschwächt. Cathepsin X ist demnach nicht in der Lage, entscheidend an der Degradation von EZM-Substraten mitzuwirken.

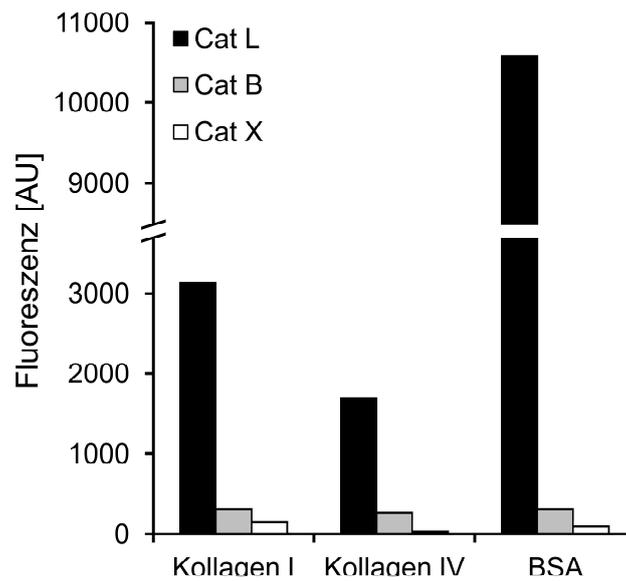


Abb. D.10: Proteolytische Spaltung von DQ-Substraten durch Cathepsine. Gequenchte fluorogene DQ-Substrate wurden mit Cathepsin B, L oder X versetzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei RT wurde die entstandene Fluoreszenz im Plattenreader gemessen ($\lambda_{\text{Excitation}} = 495 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}} = 515 \text{ nm}$). Lediglich durch Cathepsin L wurden die Substrate gut degradiert. Cathepsin B und vor allem Cathepsin X konnten die getesteten Substanzen nur in unzureichendem Maße abbauen.

D.3 Beschleunigte Seneszenz durch Cathepsin X-Defizienz

Das vorangegangene Experiment belegt, dass Cathepsin X nicht in der Lage ist, die Invasion durch den Abbau von EZM in relevantem Ausmaß zu unterstützen. Wir suchten nun nach weiteren Möglichkeiten der Beeinflussung des Invasionsverhaltens durch Cathepsin X. Ein wesentliches Merkmal, in dem sich Cathepsin X-defiziente Fibroblasten vom Wildtyp unterscheiden, ist die Zellform. Diese Zellen weisen eine veränderte Gestalt auf und wirken beim Blick durch das Mikroskop größer als Wildtyp-Zellen, was man beispielsweise auch in Abb. D.9 erkennen kann. Eine Vergrößerung des Zellvolumens könnte demnach als Ursache für eine verminderte Invasion in der Boyden-Kammer in Frage kommen. Doch wie kommt es dazu? Dieser Frage soll im folgenden Abschnitt nachgegangen werden.

Fibroblasten mit einem vergrößerten Phänotyp werden häufig im Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz erwähnt. Zu den charakteristischen Merkmalen seneszenten Zellen zählen etwa Veränderungen der Morphologie, der Proliferation oder auch der Genexpression. Da Zellen mit einem Cathepsin X-Mangel morphologisch stark an senescente Zellen erinnern, wurden humane sowie murine Fibroblasten genauer auf Seneszenz-typische Eigenschaften als Folge einer Cathepsin X-Defizienz hin untersucht.

D.3.1 Morphologie

D.3.1.1 Phänotyp Cathepsin X-defizienter Fibroblasten

Seneszente Zellen verändern typischerweise ihre Morphologie hin zu einem abgeflachten und vergrößerten Phänotyp. Ein Knockdown von Cathepsin X bewirkt in NHDF eine Transformation hin zu einer ganz ähnlichen Gestalt. Anders als die Kontrollzellen, die größtenteils lange, spindelförmige Formen annehmen, erscheinen die NHDF mit inhibierter Cathepsin X-Expression unter dem Mikroskop deutlich abgerundeter, flacher und auch größer (Abb. D.11A).

Noch deutlicher ist diese Veränderung in murinen Cathepsin X^{-/-}-Fibroblasten zu erkennen. Typisch ist hier die „Spiegelei-ähnliche“ Form der Knockout-Zellen, ganz im Gegensatz zu den schlanken Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Abb. D.11B).

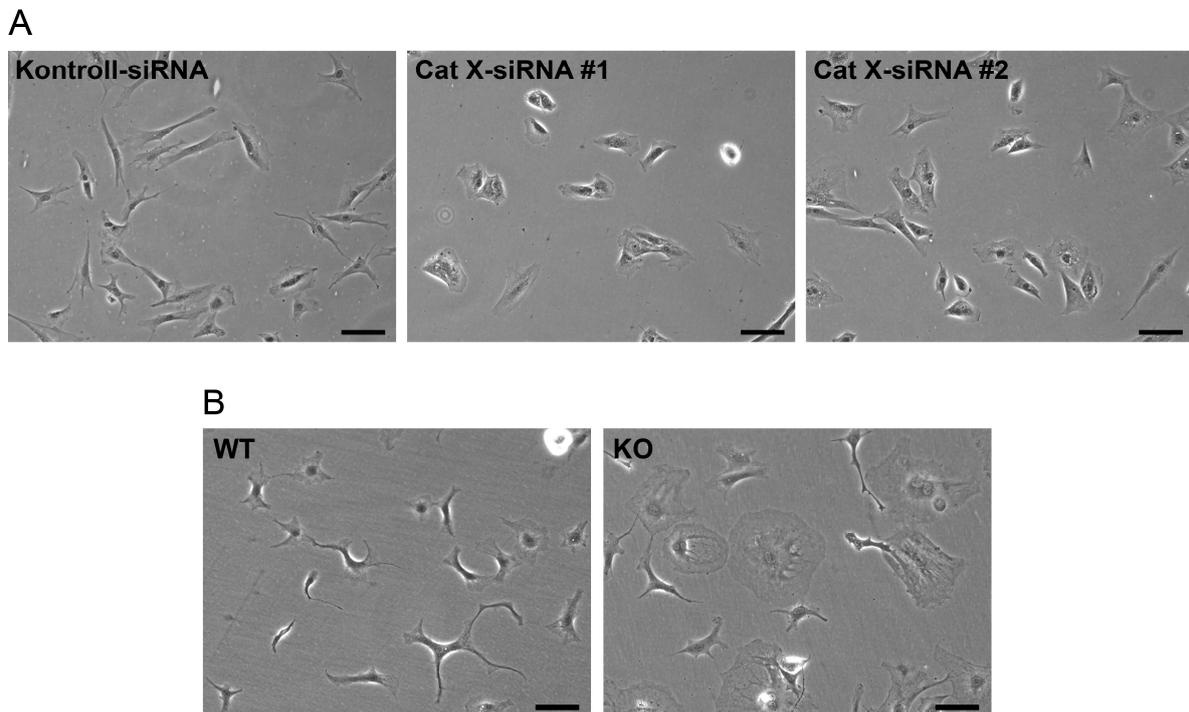


Abb. D.11: Morphologieveränderungen Cathepsin X-defizienter Fibroblasten. (A) NHDF. (B) MEF. Cathepsin X-Defizienz führt zu einem vergrößerten und abgeflachten Phänotyp. Die Zellen sind breiter und flacher. Besonders deutlich wird dies bei den murinen Fibroblasten. WT = Wildtyp, KO = Cathepsin X-Knockout. Der Größenstandard entspricht 100 μm .

D.3.1.2 Zelldurchmesser Cathepsin X-defizienter Fibroblasten

Cathepsin X-Defizienz führt also in Fibroblasten zu einer abgeflachten, vergrößert wirkenden Morphologie. Da man bei Zellen im adhärenen Zustand allerdings keine eindeutige Aussage bezüglich des Zellvolumens und damit der tatsächlichen Größe treffen kann, wurde der Durchmesser der Zellen in Suspension bestimmt, nachdem sie mittels Accutase vom Untergrund abgelöst worden waren.

Wie die mikroskopischen Aufnahmen adhärenter Fibroblasten bereits vermuten ließen, führt die Cathepsin X-Defizienz nicht nur zu einer veränderten Zellgestalt, sondern auch zu einer Vergrößerung des Volumens der Zellen. In NHDF-Kulturen wurde eine signifikante Zunahme des Zelldurchmessers von durchschnittlich $17,3 \pm 4,2 \mu\text{m}$ bei den Kontrollzellen auf $23,3 \pm 3,1 \mu\text{m}$ bzw. $22,9 \pm 3,6 \mu\text{m}$ ermittelt, falls die Zellen mit den Cathepsin X-siRNAs #1 bzw. #2 transfiziert wurden (Abb. D.12A, B). Zur Bestätigung, dass die beobachteten Effekte tatsächlich spezifisch auf die Cathepsin X-Defizienz zurückzuführen sind, wurde in einem zusätzlichen Experiment ein Cathepsin X-Überexpressionskonstrukt verwendet, um den siRNA-induzierten Knockdown von Cathepsin X aufzuheben. Da die hier verwendete siRNA gegen die 3'-UTR der mRNA gerichtet ist und dieser Bereich auf dem Expressionsvektor nicht vorhanden ist, wurde selektiv nur endogene Cathepsin X mRNA abgebaut. Die exogene Expression wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Die Kotransfektion von Plasmiden und siRNAs, die für derartige *Rescue*-Experimente erforderlich ist, ließ sich mittels einer Lipofektion, wie sie bei der reinen siRNA-Transfektion angewandt wurde, nicht mit zufriedenstellenden Transfektionseffizienzen durchführen. Aus diesem Grund wurde für die Kotransfektionen in *Rescue*-Experimenten die Elektroporation eingesetzt. Diese unsanftere Technik fügte den Zellen mehr Schaden zu als die Lipofektion, was am vergrößerten basalen Zelldurchmesser zu sehen ist (Abb. D.12B, C). Trotzdem führte die Kombination aus leerem Vektor und Cathepsin X siRNA auch hier zu nochmals vergrößerten Ausmaßen der Zellen. Diese Größenzunahme konnte erwartungsgemäß durch exogenes Cathepsin X unterdrückt werden. Bei den beobachteten zellulären Veränderungen handelt es sich demnach nicht um Artefakte, sondern sie stehen spezifisch mit der zur Verfügung stehenden Menge an Cathepsin X in Korrelation.

Auch für murine Fibroblasten wurde der Zusammenhang zwischen Cathepsin X-Defizienz und Volumenzunahme untersucht. Wie es sich beim Betrachten der adhärenen Zellen bereits andeutete, ist der gemessene Größenunterschied bei den murinen Fibroblasten noch markanter als bei den humanen Zellen. Ihr Durchmesser verdoppelte sich annähernd von $18,6 \pm 5,1 \mu\text{m}$ beim Wildtyp auf $34,2 \pm 11,2 \mu\text{m}$ bei Cathepsin X^{-/-}-Zellen (Abb. D.12D, C).

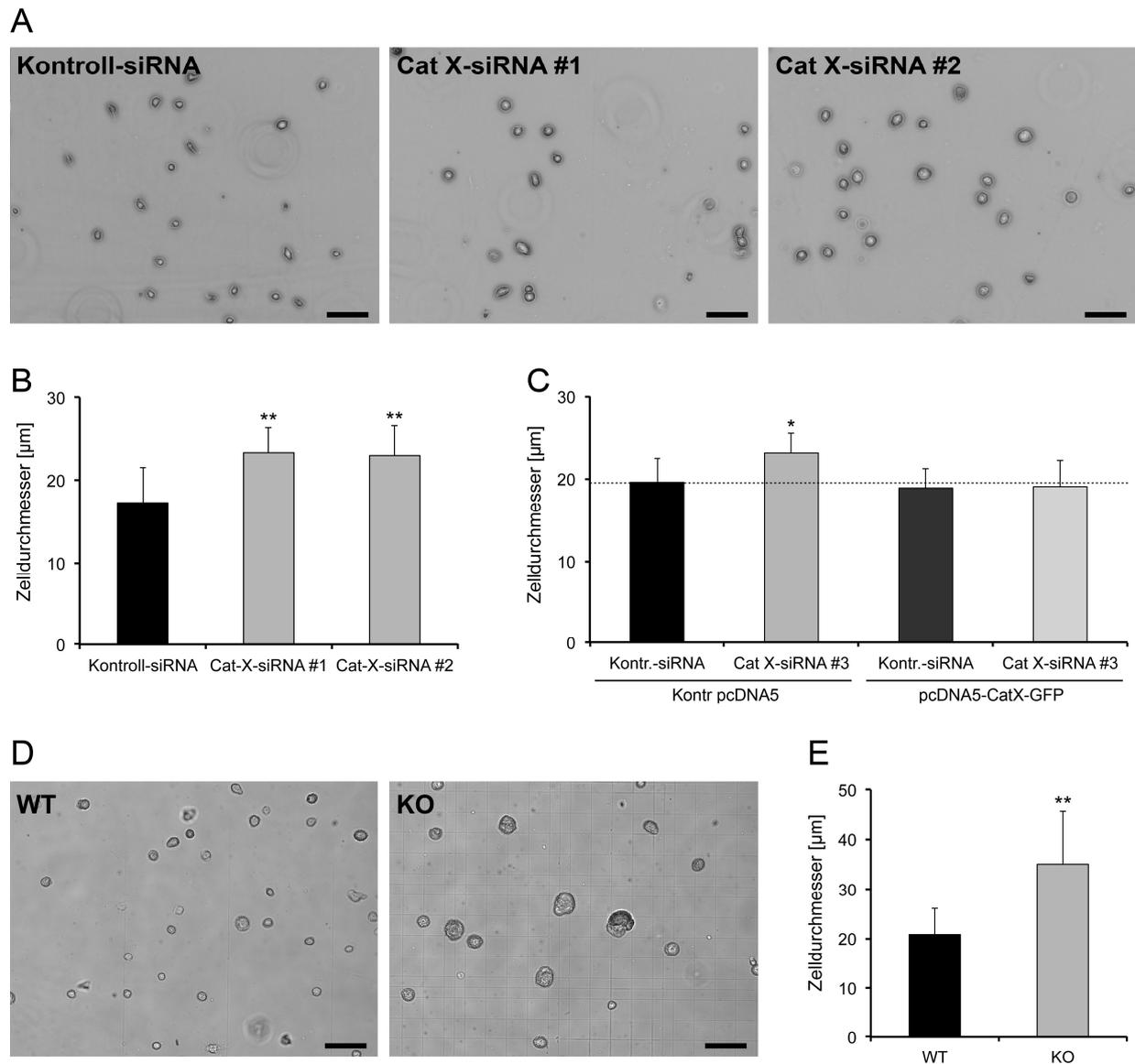


Abb. D12: Zunahme des Zellvolumens aufgrund von Cathepsin X-Defizienz. (A) NHDF in Suspension, nachdem sie mit Accutase vom Untergrund gelöst wurden. (B) Die Zelldurchmesser wurden anhand von mikroskopischen Aufnahmen abgelöster Zellen bestimmt. Beide Cathepsin X-siRNAs bewirken eine signifikante Erhöhung des Durchmessers und damit des Volumens. (C) Die Zunahme des Zelldurchmessers nach Cathepsin X-Knockdown wird durch exogene Cathepsin X-Expression mittels pcDNA5-CatX-GFP aufgehoben. (D) MEF in Suspension. (E) Auswertung der Aufnahmen der Suspensionszellen. Die Cathepsin X-defizienten MEF wiesen einen über 1,5-fach vergrößerten Durchmesser im Vergleich zum Wildtyp auf. WT = Wildtyp, KO = Cathepsin X-Knockout. Der Größenstandard entspricht 100 μm .

D.3.2 Proliferationsverhalten Cathepsin X-defizienter Fibroblasten

Um zu überprüfen, ob die Cathepsin X-defizienten Zellen neben dem Größenzuwachs auch den für die Seneszenz charakteristischen Proliferationsverlust aufweisen, wurden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit der Fibroblastenkulturen angewandt. So wurden die MEF für die Berechnung der Populationsverdopplungsrate bei jedem Passagieren in der Neubauer-Kammer gezählt. Weiterhin lassen sich über den DNA-Gehalt einer Kultur Rückschlüsse auf die Zellzahl ziehen, wie dies beim CyQUANT® NF Assay der Fall ist. Auf einem ähnlichen Prinzip basiert die Zellzahlbestimmung mittels Bromodesoxyuridin (BrdU), wobei hier nicht der Gesamt-DNA-Gehalt gemessen wird, sondern lediglich die Menge DNA, die innerhalb eines bestimmten Zeitfensters neu synthetisiert wurde.

D.3.2.1 Zellzahlbestimmung über den DNA-Gehalt und Populationsverdopplungsrate

Der CyQUANT® NF Assay der Firma Invitrogen basiert auf einem fluoreszenten Farbstoff, der an die DNA bindet und anschließend detektiert wird. Die Intensität der Fluoreszenz ist somit ein Maß für die vorliegende Zellzahl.

Entsprechend unseren Erwartungen wurde mit diesem Assay eine deutliche Reduktion der Proliferation Cathepsin X-defizienter NHDF festgestellt (Abb. D.13A). Der Anstieg der Fluoreszenz innerhalb von drei Tagen nach Testbeginn betrug nach Knockdown von Cathepsin X mit zwei unterschiedlichen siRNAs lediglich noch 39% bzw. 59% relativ zu Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

Ähnlich verhielten sich auch die murinen Fibroblasten (MEF): im Beobachtungszeitraum von 72 h betrug der bei Cathepsin X^{-/-}-Zellen gemessene Fluoreszenzanstieg nur etwa 1/3 relativ zum Wildtyp (Abb. D.13B). Für die murinen primären Fibroblasten wurde weiterhin die Zahl der Populationsverdopplungen über einen Zeitraum von 23 Tagen bestimmt. Wildtyp-MEF erreichten bis Tag 13 4,5 Populationsverdopplungen und stagnierten dann (Abb. D.13C). Durch anhaltende Zellteilung konnte die Zellzahl in der folgenden Zeit jedoch konstant gehalten und der Verlust abgestorbener Zellen ausgeglichen werden. Dies war bei Cathepsin X^{-/-}-MEF nicht der Fall. Diese stellten etwa ab Tag 3 das Wachstum annähernd komplett ein, was bis Tag 18 zu einer kontinuierlichen Abnahme der Zellzahl führte, sodass ein weiteres Passagieren schließlich nicht mehr möglich war.

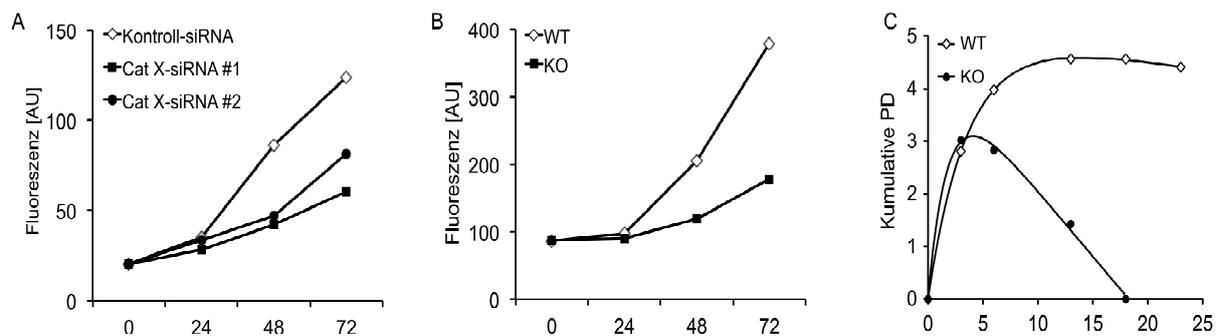


Abb. D.15: Teilungsverhalten humaner und muriner Fibroblasten. (A) Die Proliferation von NHDF wurde 3 Tage nach Transfektion mittels des CyQuant Assays untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle war der Fluoreszenzanstieg der Cathepsin X-defizienten NHDF um die 50 % vermindert. (B) Noch eindeutiger ist der Zusammenhang zwischen der Cathepsin X-Defizienz und verminderter Proliferation bei MEF. Hier war in den Cathepsin X^{-/-}-Kulturen nach 3 Tagen nur etwa 1/3 der Fluoreszenzzunahme des Wildtyps festzustellen. (C) Ähnliche Schlussfolgerungen liefert auch die Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplungen (PD). Während bei Wildtyp-MEF die Zellzahl bis etwa Tag 13 anstieg und sich danach Zellverluste und Zellteilung die Waage hielten, kam es bei den Knockout-Zellen bereits nach etwa 4 Tagen zu einem stetigen Verlust der Zellzahl. WT = Wildtyp, KO = Cathepsin X-Knockout. Die Werte sind repräsentative Daten aus 3 unabhängigen Experimenten.

D.3.2.2 Bestimmung der Proliferation von Fibroblasten mittels BrdU-Inkorporation

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Proliferationspotentials ist die Messung der DNA-Syntheserate anhand von BrdU. BrdU ist ein DNA-Basenalogon und wird während der DNA-Synthese anstelle von Thymidin eingebaut. Mit Hilfe BrdU-gerichteter Antikörper können mittels ELISA-Analyse die Syntheseraten der Zellen verglichen werden.

Die mittels CyQUANT erhaltenen Ergebnisse konnten mit dieser Methode bestätigt werden. Bei NHDF betrug die gemessene Syntheseleistung nach Transfektion der beiden Cathepsin X-siRNAs #1 und #2 im Vergleich zur Kontrolle nur $54 \pm 17\%$ bzw. $53 \pm 24\%$ (Abb. D.14A). Zur Bestätigung des Einflusses von Cathepsin X auf die Zellproliferation wurde dieses Experiment zusätzlich mit NHDF durchgeführt, in denen ein *Rescue* der Cathepsin X-Expression herbeigeführt wurde. Dabei wurde die durch siRNAs inhibierte Expression der Protease durch eine exogene Überexpression wieder ausgeglichen, wodurch sich in der Folge die Proliferationsrate ebenfalls normalisieren sollte. Diese theoretischen Überlegungen konnten im Experiment bestätigt werden (Abb. D.14B). So führte die Kombination aus Cathepsin X-siRNA und exogener Überexpression im BrdU-ELISA zu vergleichbaren Absorptionswerten wie in der Kontrolle mit Kontroll-siRNA und leerem Vektor. Ohne Cathepsin X-siRNA führte die exogene Überexpression sogar zu Absorptionswerten, die um 30 % höher lagen als in der Kontrolle.

Für MEF wurde ebenfalls eine erniedrigte DNA-Syntheserate der Cathepsin X^{-/-}-Kulturen nachgewiesen. Bei diesen Zellen war die BrdU-Aufnahme durchschnittlich um 51±9% reduziert, was gut mit den Ergebnissen der humanen Fibroblasten übereinstimmt (Abb. D.14C).

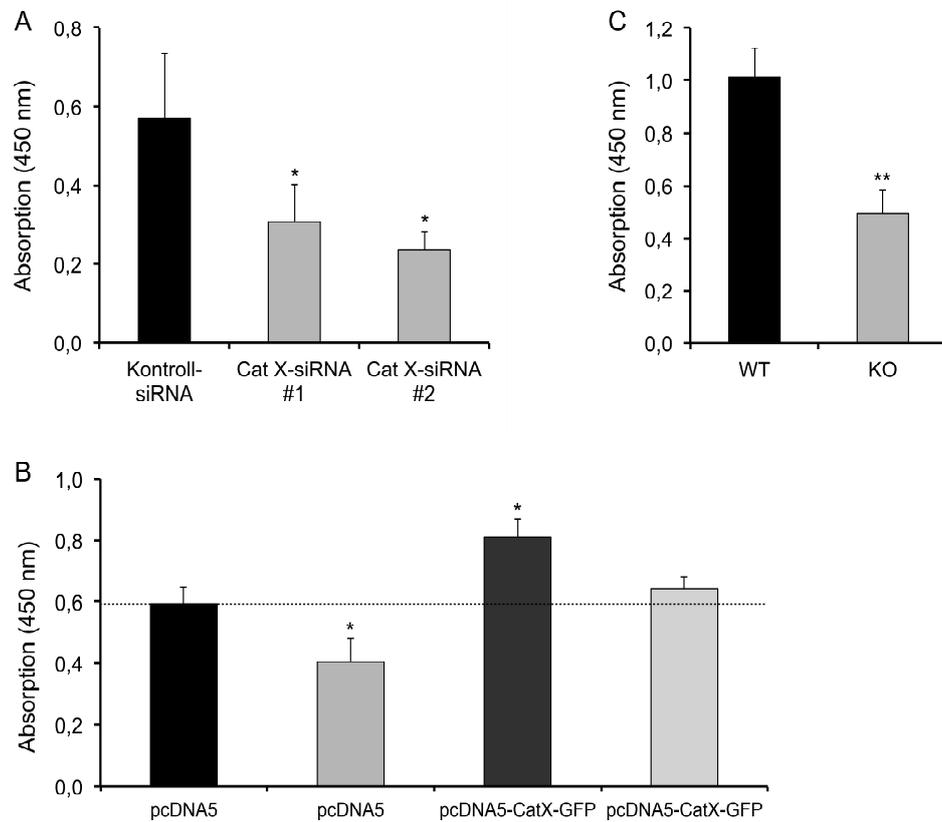


Abb. D.14: Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die Proliferation (BrdU-ELISA). Die Zellen wurden für 2 h mit BrdU inkubiert und anschließend die Menge an aufgenommenem BrdU im ELISA bestimmt. (A) In NHDF führten beide getesteten siRNAs zu einer signifikanten Verringerung der DNA-Syntheserate. (B) Durch exogene Expression von Cathepsin X wurden die Effekte der Cathepsin X-siRNA ausgeglichen (C) Die BrdU-Aufnahme von Cathepsin X^{-/-} MEF war um etwa 50 % reduziert. WT = Wildtyp, KO = Cathepsin X-Knockout.

D.3.3 Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die Apoptose

Wie die vorangegangenen Proliferations-Assays belegen konnten, weisen die Cathepsin X-defizienten Fibroblasten ein verlangsamtes Wachstum auf. Jedoch können verringerte Zellzahlen nicht nur aufgrund einer verminderten Proliferation zustande kommen, sondern auch eine verstärkt ablaufende Apoptose kann zu derartigen Ergebnissen führen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Apoptoserate der Zellen unter Anwendung zweier unterschiedlicher Techniken gemessen.

D.3.3.1 Apoptosemessung in Fibroblasten mittels Annexin V-Markierung

Einer der ersten Prozesse während der Apoptose ist der Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran. Dies führt dazu, dass Phosphatidylserin, welches unter normalen Bedingungen ausschließlich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran vorkommt, an die Außenseite der Lipiddoppelschicht gelangt. Annexin V ist ein Phospholipid-Bindeprotein und bindet selektiv Phosphatidylserin. Gibt man FITC-gekoppeltes Annexin V zu den Zellen, kann es an die exponierten Phosphatidylserine einer apoptotischen Zelle binden, was über mikroskopische oder durchflusscytometrische Methoden nachweisbar ist. Um die so markierten früh-apoptotischen Zellen von nekrotischen Zellen bzw. von Zellen in einer fortgeschrittenen Phase der Apoptose zu unterscheiden, enthält die Färbelösung zusätzlich Propidiumjodid (PI). Dieser Farbstoff kann die Plasmamembran einer intakten Zelle nicht durchdringen. Ist die Membranintegrität jedoch durch Nekrose oder fortgeschrittene Apoptose bereits geschädigt, kann PI in die Zelle eindringen und die enthaltenen Nukleinsäuren anfärben. Mit dieser Vorgehensweise kann man somit drei Fraktionen an Zellen unterscheiden: Gesunde Zellen (negativ für beide Farbstoffe), Zellen in einer frühen Phase der Apoptose (FITC-positiv) und Zellen, die sich in einer späten Phase der Apoptose befinden oder nekrotisch sind (FITC- und PI-positiv). Für diese Studien wurde der *FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences, Bedford, USA) in Kombination mit einem Durchflusscytometer verwendet.

Die durchflusscytometrischen Analysen von NHDF unter normalen Wachstumsbedingungen ergaben für Kontroll- und Cathepsin X-defiziente Zellen ein vergleichbares Bild in Bezug auf ihr Färbeverhalten. In beiden Fällen existierte im Wesentlichen nur eine Hauptpopulation von Zellen, die sowohl FITC- als auch PI-negativ waren (Abb. D.15). Nur vereinzelte Zellen setzten sich etwas von der Hauptpopulation ab und waren stärker mit FITC oder PI angefärbt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen vor der Analyse mit dem Apoptose-induzierenden Alkaloid Staurosporin inkubiert. Nach dieser Behandlung waren zwei große Subpopulationen erkennbar, die sich in der Menge an aufgenommenem FITC-Annexin V unterschieden, wobei die Menge des aufgenommenem Propidiumjodids vergleichbar niedrig war. Allerdings konnten diese beiden Populationen nicht klar getrennt werden, sondern sie überlappten sich zu großen Teilen. Zusätzlich tauchten auch vermehrt doppelt-positive Zellen auf, deren Plasmamembran bereits permeabel geworden war. Aber auch hier konnten keine markanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Cathepsin X-defizienten Zellen festgestellt werden.

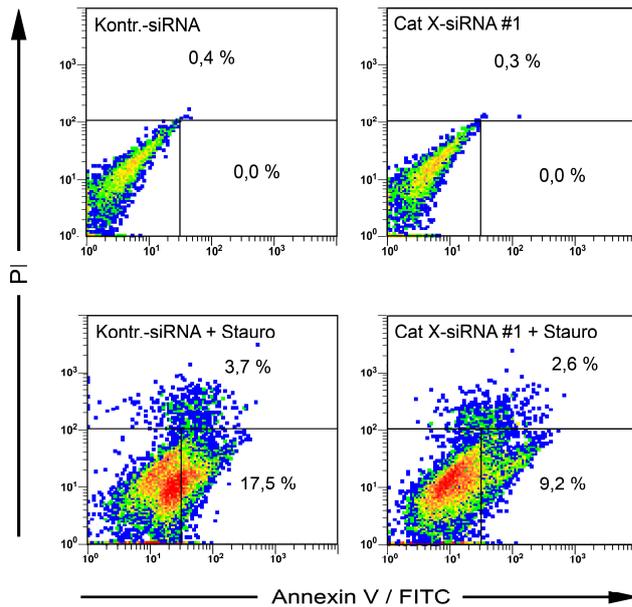


Abb. D.15: Durchflusscytometrische Bestimmung der Apoptose in NHDF über Annexin V. Unter basalen Bedingungen traten keine Unterschiede zwischen Cathepsin X-defizienten Zellen und Kontrollzellen auf. Die Kulturen befanden sich in einem gesunden Zustand, und fast alle Zellen waren vital. Nach Staurosporin-Zugabe wurde eine zweite Population mit erhöhter Annexin V-Konzentration sichtbar. Zusätzlich tauchten vermehrt PI/Annexin-doppelt-positive Zellen auf, deren Zellmembran bereits permeabel geworden war. Dargestellt sind repräsentative Daten aus 3 unabhängigen Experimenten.

Bei Versuchen mit murinen Fibroblasten (MEF) waren die Ergebnisse sehr gut mit denen der NHDF vergleichbar. Cathepsin X^{-/-}-Zellen zeigten unter normalen Bedingungen keine Abweichungen von den Kontrollzellen hinsichtlich ihrer Vitalität. Wurde dagegen Staurosporin als Apoptoseinduktor zugegeben, führte dies in beiden Fällen zu einer vergleichbaren Zunahme FITC-positiver und damit apoptotischer Zellen (Abb. D.16). Jedoch gingen auch hier, ähnlich wie bei NHDF, beide Fraktionen ineinander über, was eine exakte Quantifizierung unmöglich machte. Da sich diese Methode als ungeeignet herausstellte, um gesunde von leicht bis mäßig apoptotischen Kulturen eindeutig zu unterscheiden, wurde in der Folge ein weiteres Verfahren zur Apoptosebestimmung angewandt, welches auf enzymkinetischer Messung der Caspase-3-Aktivität beruht.

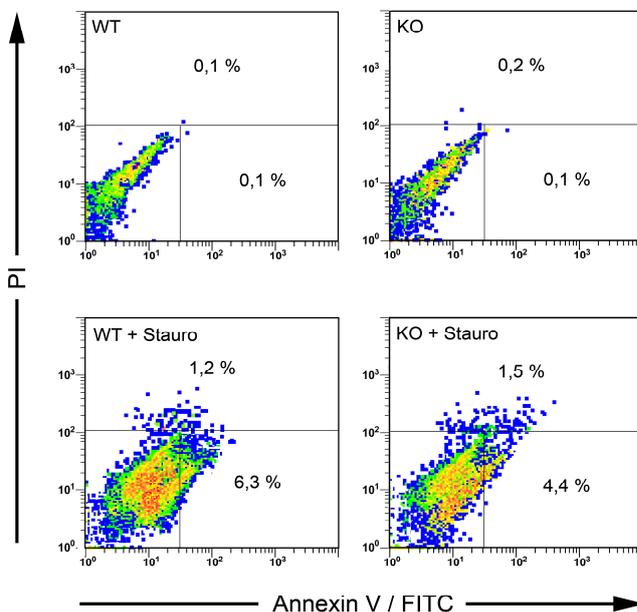


Abb. D.16: Durchflusscytometrische Bestimmung der Apoptose in MEF über Annexin V. Ebenso wie bei NHDF verhalten sich Wildtyp und Cathepsin X-Knockout-Zellen identisch. Die Behandlung mit Staurosporin führte ebenfalls zu Zellen mit erhöhter Annexin V-Aufnahme. Reproduzierbare Unterschiede zwischen Wildtyp und Cathepsin X^{-/-} Zellen traten weder unter Normalbedingungen noch nach Zugabe von Staurosporin auf. WT = Wildtyp, KO = Cathepsin X-Knockout. Dargestellt sind repräsentative Daten aus 3 unabhängigen Experimenten.

D.3.3.2 Apoptosemessung über die Caspase 3-Aktivität

Apoptose ist ein hoch regulierter Mechanismus des Zelltods. Entscheidend für dieses programmierte Absterben einer Zelle ist die Aktivierung des Caspasenetzwerks über verschiedene Signalwege. Eine wichtige Effektorcaspase in dieser Kaskade ist Caspase 3, die, zusammen mit weiteren Caspasen, verantwortlich ist für die Spaltung essentieller zellulärer Proteine wie beispielsweise Bestandteilen des Cytoskeletts. Über die Messung der Aktivität dieser Protease in Zellysaten lässt sich sehr genau ermitteln, ob und in welchem Ausmaß in den entsprechenden Zellen Apoptose stattfand. In unserem Fall wurde zur Aktivitätsbestimmung das Caspase 3-Substrat Z-DEVD-AFC verwendet, welches nach Spaltung ein Fluoreszenzsignal über das Fluorophor 7-Amino-4-trifluormethylcumarin (AFC) abgibt. Somit ist die Intensität der Fluoreszenz ein direktes Maß für die Apoptoserate.

Misst man unter regulären Wachstumsbedingungen die Caspase 3-Aktivität in NHDF, sind keine Unterschiede zwischen Cathepsin X-defizienten und Kontrollzellen feststellbar. Wurden die Lysate zusätzlich mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK versetzt, ergab sich keine relevante Erniedrigung der gemessenen Aktivitäten (Abb. D.17A). Das bedeutet somit, dass unter Normalbedingungen praktisch keine Apoptose stattfindet und die gemessene Restaktivität auf andere Proteasen zurückzuführen und nicht spezifisch Caspase-3 zuzuordnen ist. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin inkubiert, welcher in vielen Zelltypen Apoptose induziert. Dies bewirkte eine Vervielfachung des gemessenen Signals um den Faktor 4-5, welches durch Z-VAD-FMK annähernd wieder auf das Basalniveau zurückfiel und somit also Caspase-spezifischen Ursprungs ist. Jedoch hatte auch hier die Cathepsin X-Defizienz keinen signifikanten Einfluss auf die Caspase 3-Aktivität.

MEF-Zellen verhielten sich in diesem Experiment sehr ähnlich. Im Grundzustand waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Cathepsin^{-/-}-Zellen messbar (Abb. D.17B). Mit Staurosporin konnte in beiden Fällen eine deutliche Aktivierung der Caspase 3 induziert werden, welche durch den Inhibitor wieder aufgehoben wurde. Das Fehlen von Cathepsin X wirkte sich demnach auch in MEF weder positiv noch negativ auf die Caspase 3-Aktivität aus.

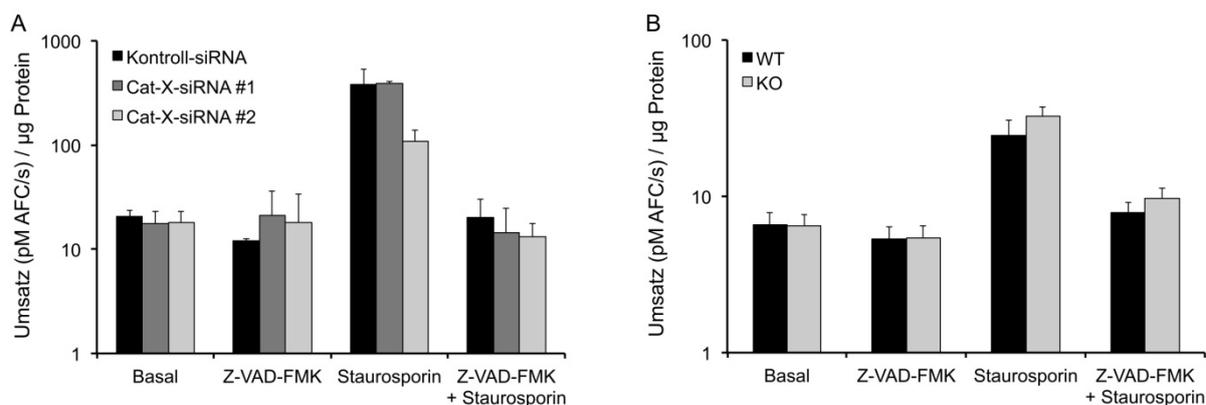


Abb. D.17: Caspase 3-Aktivität in Fibroblasten. Die Zellen wurden unter normalen Kulturbedingungen oder in Gegenwart von Staurosporin inkubiert und die daraus gewonnenen Lysate auf ihre Caspase 3-Aktivität untersucht. Als Negativkontrolle wurden die Lysate vor Beginn der Messung mit Z-VAD-FMK inkubiert. (A) Weder unter Normalbedingungen noch nach künstlicher Apoptoseinduktion unterscheiden sich Cathepsin X-defiziente NHDF von der Kontrolle. Mit Z-VAD-FMK fällt die Caspase 3-Aktivität wieder auf das Basalniveau zurück. (B) Wie schon bei NHDF beeinflusst die Cathepsin X-Defizienz die Caspase 3 auch in MEF nicht in ihrer Aktivität.

D.3.4 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität in NHDF

Ein weiteres charakteristisches Kennzeichen der zellulären Seneszenz ist eine erhöhte Aktivität der sogenannten Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal). Diese wird bei pH 6,0 gemessen und ist typischerweise in seneszenten Zellen detektierbar, jedoch nicht in proliferierenden Zellen (Dimri et al., 1995). SA- β -Gal ist ein häufig verwendeter Biomarker für zelluläre Seneszenz, dessen Nachweis auf der Spaltung des chromogenen Substrats X-Gal beruht.

Dieser Test wurde ausschließlich mit NHDF durchgeführt, da die Cathepsin X-defizienten MEF, im Gegensatz zu den Wildtyp-Fibroblasten, über eine β -geo Reporter-kassette verfügen, welche für β -Galaktosidase kodiert (Sevenich et al., 2010). Ein Knockdown von Cathepsin X führt in NHDF zu einer gesteigerten Aktivität der SA- β -Gal, was sich in einer intensiveren Blaufärbung der Zellen nach X-Gal-Zugabe äußert. Zur genaueren Quantifizierung wurde ein Färbe-Index erstellt, welcher nach Cathepsin X-Knockdown eine signifikante Steigerung Färbeintensität von $0,14 \pm 0,07$ auf $0,87 \pm 0,12$ (siRNA #1) bzw. $0,70 \pm 0,19$ (siRNA #2) ergab (Abb. D.18A, B). In *Rescue*-Experimenten konnte die durch die Cathepsin X-siRNA hervorgerufene verstärkte SA- β -Gal-Aktivität durch exogenes Cathepsin X vollständig aufgehoben werden, die Aktivität lag dabei sogar noch unterhalb der in der Kontrolle gefundenen Werte (Abb. D.18C). Auffällig ist bei diesem Experiment, dass die basalen Färbewerte hier deutlich höher liegen als bei den Zellen, die ausschließlich mit siRNAs durch eine Lipofektion transfiziert wurden. Dies ist vermutlich auf den deutlich erhöhten Stress zurückzuführen, den die in den *Rescue*-Experimenten eingesetzte Plasmid-Elektroporation im Vergleich zur reinen siRNA-Lipofektion verursacht.

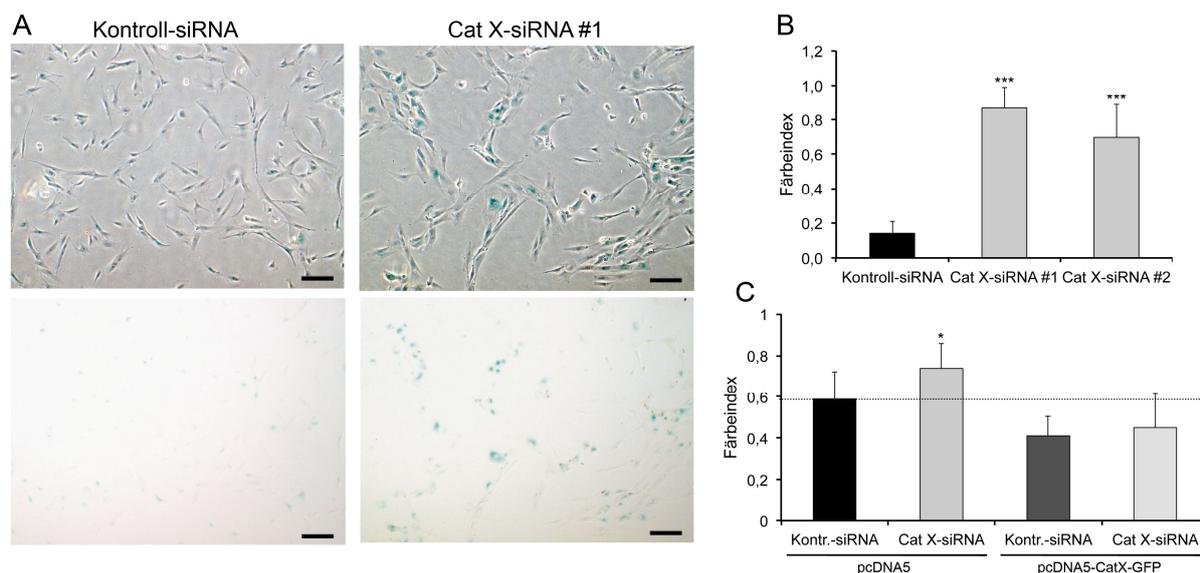


Abb. D18: SA-β-Galaktosidase-Aktivität in NHDF. NHDF wurden 3 Tage nach Transfektion fixiert und zur SA-β-Gal-Bestimmung mit X-Gal gefärbt. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von NHDF nach X-Gal-Färbung. Die obere Reihe zeigt in den Phasenkontrastaufnahmen die Morphologie der Zellen, die untere Reihe zeigt ausschließlich die Färbung derselben Ausschnitte. Der Größenstandard entspricht 100 μm. (B, C) Der Färbeindex der Kulturen wurde berechnet und grafisch dargestellt. Der Knockdown von Cathepsin X führt zu einer signifikanten Erhöhung der Färbeintensität, welche durch exogene Cathepsin X-Expression unterdrückt werden kann.

D.3.5 Seneszenz-assoziierte Genexpression in Fibroblasten

Die SA-β-Galaktosidase kann in fast allen Arten seneszenten Zellen nachgewiesen werden. Nachdem diese Enzymaktivität aber auch Folge anderer Prozesse neben der Seneszenz sein kann, wie beispielsweise einer längeren Kultivierung unter konfluenten Bedingungen, testeten wir die Cathepsin X-defizienten Zellen auf weitere Marker für zelluläre Seneszenz. Da seneszente Zellen häufig eine verstärkte Expression der *cyclin dependend kinase inhibitors* (CDKIs) p16^{Ink4A} und p21^{CIP1} aufweisen, wurden Cathepsin X-defiziente Fibroblasten daraufhin untersucht. Zusätzlich wurden auch die Expressionsraten des Tumorsuppressors p53 sowie des Membranproteins Caveolin-1 ermittelt, die bei Seneszenz ebenfalls häufig erhöhte Werte aufweisen. Die relativen Verhältnisse der durch quantitative RT-PCR erhaltenen mRNA-Mengen waren für NHDF und MEF sehr ähnlich (Abb. D.19A, B). Die geringsten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle wies jeweils p16 auf, das auf Proteinebene zudem in keinem der beiden zellulären Systeme detektiert werden konnte. Die mRNA-Mengen für p21, p53 sowie Caveolin waren im Vergleich zu p16 stärker erhöht. Die daraus resultierenden erhöhten Proteinmengen dieser 3 Marker konnten im Immunoblot jeweils in zumindest einer Spezies nachgewiesen werden (Abb. D.19C, D).

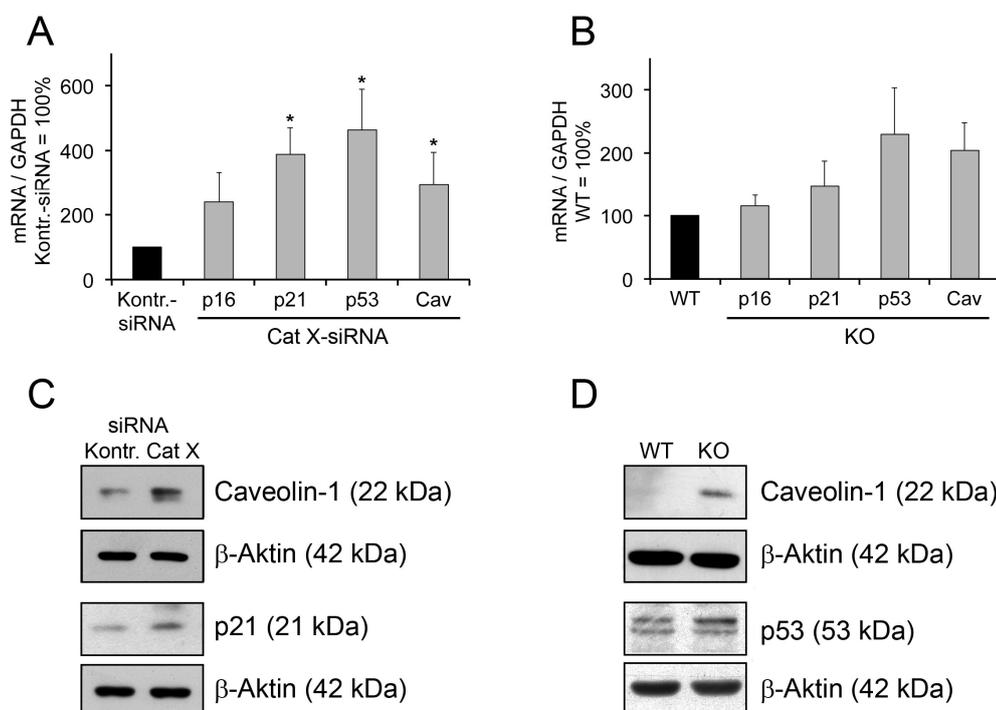


Abb. D.19: Seneszenz-assoziierte Genexpression in Cathepsin X-defizienten Fibroblasten. (A, B) Die mRNA-Konzentrationen für p16, p21, p53 sowie Caveolin-1 sind in Cathepsin X-defizienten Fibroblasten erhöht. Die Daten sind Mittelwerte aus mind. 2 unabhängigen Experimenten. (C) Lysate von NHDF zeigen im Western Blot eine erhöhte Proteinmenge von Caveolin-1 und p21. (D) In Lysaten von Cathepsin X-defizienten MEF wurden mittels Western Blot erhöhte Mengen von Caveolin-1 und p53 nachgewiesen. WT = Wildtyp, KO = Cathepsin X-Knockout.

D.3.6 Zellzyklusanalysen

Die bisherigen Ergebnisse können belegen, dass Fibroblasten unter dem Einfluss der Cathepsin X-Defizienz einen seneszenten Phänotyp ausbilden, der sich neben der Expression verschiedener biochemischer Marker auch in einer verminderten Proliferation der Kulturen äußert. Dieser Proliferationsdefekt sollte nun im Hinblick auf den Zellzyklus weiter charakterisiert werden.

D.3.6.1 Analyse der Zellzyklusverteilung unter Verwendung von Propidiumjodid

Zunächst wurde die Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit Hilfe des Nukleinsäure-Interkalators Propidiumjodid (PI) betrachtet. Da sich die Menge an aufgenommenem Propidiumjodid proportional zur Menge der vorhandenen DNA in einer Zelle verhält, können bei der Analyse im Durchflusscytometer auf diese Weise die verschiedenen Zellzyklusphasen mit ihren jeweiligen charakteristischen DNA-Gehalten unterschieden werden.

Die Ergebnisse der durchflusscytometrischen Untersuchungen zeigten sowohl für NHDF als auch für MEF eine leichte Reduktion der Anteile an Zellen in S- und G₂-Phase des Zellzyklus

(Abb. D.20), was auf einen partiellen Zellzyklusarrest aufgrund einer verminderten Syntheserate hindeutet. Dies ist vermutlich eine der Ursachen für die verminderte Proliferation der Fibroblasten nach Cathepsin X-Knockout oder -Knockdown. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass das Fehlen von Cathepsin X zu einer reduzierten BrdU-Inkorporation führt (siehe D.3.2.2).

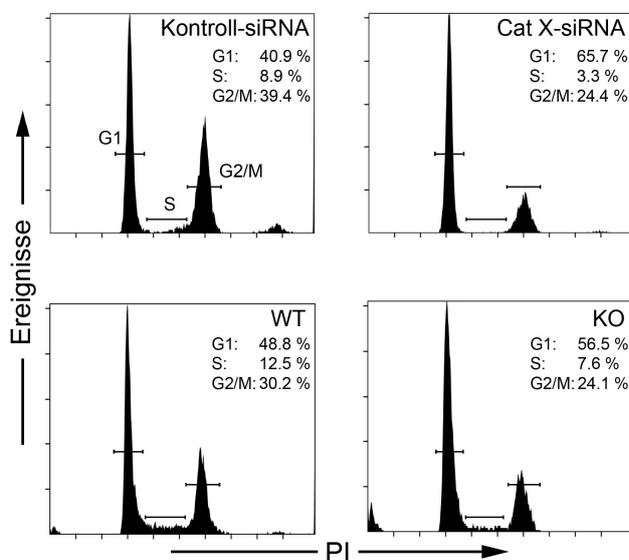


Abb. D.20: DNA-Histogramme von Cathepsin X-defizienten und Kontrollzellen. NHDF (obere Reihe) und MEF (untere Reihe) wurden mit Propidiumjodid gefärbt und der DNA-Gehalt durchflusscytometrisch bestimmt. Die Daten zeigen in Cathepsin X-defizienten Fibroblastenkulturen einen leichten Rückgang der Zellen in der S- und G2-Phase des Zellzyklus. Im Gegenzug erhöht sich der Anteil an Zellen, die sich in G1 befinden. Dies deutet auf einen partiellen Zellzyklusarrest in G1 hin.

D.3.6.2 Analyse der Zellzyklusprogression mittels BrdU Pulse-Chase

Um den veränderten Zellzyklus noch genauer zu untersuchen, wurde die Zellzyklus-Progression in einem BrdU Pulse-Chase-Experiment analysiert, wodurch die Zellzyklusdauer der unterschiedlich behandelten Kulturen verglichen werden kann.

NHDF wurden dazu einem 60-minütigen BrdU-Puls ausgesetzt und anschließend der Verlauf des Zellzyklus über 24 Stunden verfolgt. Innerhalb des 1-stündigen BrdU-Pulses nahmen 12 % der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen BrdU auf. Diese Zellen befanden sich demnach zum Zeitpunkt des BrdU-Pulses in der S-Phase. Dagegen war dies nur bei 2,5 % der mit Cathepsin X-siRNA behandelten Fibroblasten der Fall (Abb. D.21). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten des BrdU-ELISAs (D.3.2.2) und deutet auf eine verminderte DNA-Syntheserate hin, welche eine insgesamt verlängerte Zellzykluszeit zur Folge hat. Das Fehlen eines erneuten Anstiegs der BrdU-positiven S-Phase-Zellen innerhalb der 24 Stunden zeigt, dass NHDF, welche einer Transfektion unterzogen wurden, während dieser Zeit keinen vollständigen Zellzyklus durchlaufen. Dies gilt jedoch nur für transfizierte NHDF. Unabhängig von der Art der verwendeten siRNA konnten wir in der täglichen Zellkultur beobachten, dass sich eine Transfektion prinzipiell negativ auf die Teilungsrate der Kulturen auswirkt. Völlig unbehandelte NHDF-Kulturen wurden keinem BrdU Pulse-Chase-Experiment ausgesetzt, es ist jedoch davon auszugehen, dass die Zellzyklusgeschwindigkeit bei diesen Zellen etwas höher liegt als bei den mit der Kontroll-siRNA-transfizierten NHDF.

Der Anteil der BrdU-positiven Zellen in G_1 stieg bei *non-silencing*-transfizierten Zellen deutlich steiler an als bei Cathepsin X-defizienten Zellen. Auch die Zahl BrdU-positiver Zellen in G_2 war bei mit Cathepsin X-siRNA transfizierten Zellen über den gesamten Verlauf niedriger als in der Kontrolle. Zusammengenommen zeigen diese Daten einen insgesamt verlangsamten Zellzyklus, jedoch ohne einen nennenswerten Zellzyklusarrest in einer bestimmten Phase.

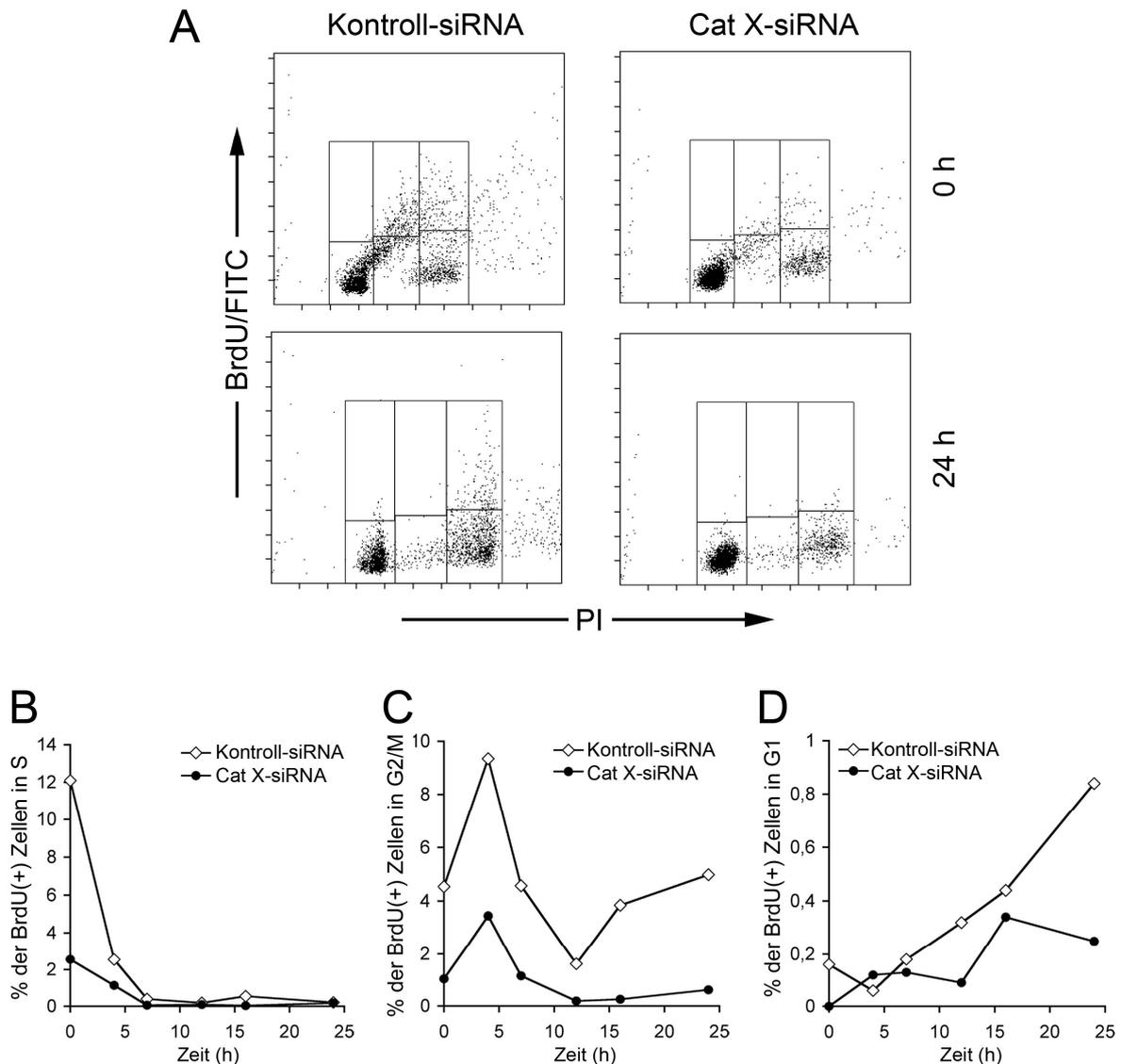


Abb. D.21: Verzögerte Zellzyklusprogression Cathepsin X-defizienter NHDF. Die Zellen wurden durch einen BrdU-Puls markiert und anschließend mit Propidiumjodid und einem FITC-konjugierten Antikörper gegen BrdU gefärbt, um sie durchflusscytometrisch zu untersuchen. (A) Repräsentative Histogramme der Zeitpunkte 0 und 24 Stunden. (B) Verminderte DNA-Syntheserate Cathepsin X-defizienter Fibroblasten. (C) Der Anteil der BrdU(+) Zellen ist bei Cathepsin X-Defizient über den gesamten Zellzyklus hinweg deutlich erniedrigt. (D) Verlangsamter Eintritt der Cathepsin X-defizienten NHDF in die G_1 -Phase.

D.4. Untersuchungen zum Mechanismus der durch Cathepsin X-Defizienz ausgelösten Seneszenz

Nach unseren bisherigen Erkenntnissen führt Cathepsin X-Defizienz in Fibroblasten zu einem seneszenten Phänotyp, der durch eine verminderte Proliferation, einen veränderten Zellzyklus sowie die Expression Seneszenz-assoziiierter Gene gekennzeichnet ist. Bisher blieb jedoch unklar, welche *upstream*-gelegenen Prozesse oder Signalwege durch das Fehlen von Cathepsin X verändert sind und diese Effekte auslösen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse auf den folgenden Seiten beschrieben werden.

D.4.1 Untersuchung des IGF-Signalwegs

Ein zentraler Signaltransduktionsweg, der unter anderem zelluläre Prozesse wie Proliferation oder Apoptose steuert und reguliert, ist der *insulin-like growth factor* (IGF)-Signalweg. Da extrazelluläres Cathepsin X, wie auch die anderen sezernierten Cathepsine, Mannose-6-Phosphat (M6P)-Signale aufweist, worüber es an den IGF-II-Rezeptor binden kann, erscheint es plausibel, dass Cathepsin X über diese Strukturen auf dieses System Einfluss nehmen kann. Diese Hypothese sollte im Folgenden untersucht werden. Bei allen nachfolgend beschriebenen Experimenten kamen Prostatakarzinomzellen statt der zuvor verwendeten Fibroblasten zum Einsatz. Der Wechsel zu einem anderen Zelltyp war notwendig, da Fibroblasten den IGF-I-Rezeptor nicht in ausreichendem Maße exprimieren, um eine Aktivierung desselben mittels Immunoblot nachzuweisen. Prostatakarzinom-Zellen hingegen weisen eine sehr hohe Expression des IGF-I-Rezeptors auf. Es wurden 2 derartige Zelllinien analysiert: PC-3-Zellen, welche aus einer Knochenmetastase isoliert wurden, sowie LNCaP-Zellen, welche aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen wurden. Wie auch in NHDF, wurde in den Tumorzellen ein transienter Knockdown von Cathepsin X mittels einer Lipofektion induziert und die Versuche 3 Tage nach Transfektion durchgeführt.

D.4.1.1 Nachweis von IGF-IR

Zunächst wurde auf RNA-Ebene untersucht, wie sich der Knockdown von Cathepsin X auf die Expression der beiden IGF-Rezeptoren auswirkt. Zusätzlich wurde auch die Expression des Kationen-abhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptors ermittelt, dessen Funktionen sich teilweise mit denen des Kationen-unabhängigen M6P/IGF-II-Rezeptors überschneiden, da beide am Transport lysosomaler Proteine vom Golgi-Apparat und der Zelloberfläche beteiligt sind. Im Falle des IGF-I-Rezeptors stellten wir sowohl in PC-3- als auch LNCaP-Zellen eine leichte, jedoch signifikante Erhöhung der mRNA-Transkriptmengen um etwa 60 % fest (Abb. D.22). Die Expression des IGF-II/M6P-Rezeptors (Kationen-unabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) und des Kationen-abhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR) blieb dagegen unbeeinflusst durch die Downregulation von Cathepsin X.

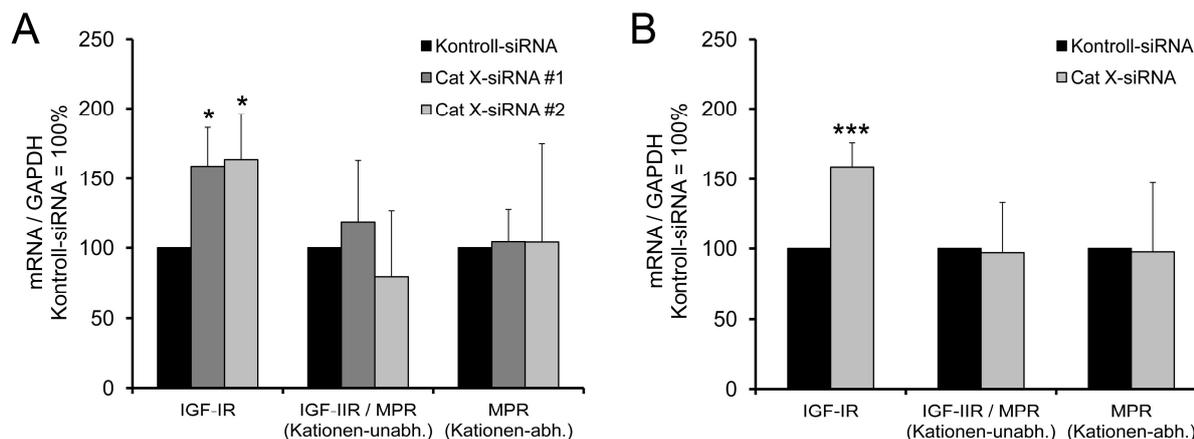


Abb. D.22: Erhöhte IGF-IR-Expression nach Cathepsin X-Knockdown in Prostatakarzinom-Zellen. Mittels quantitativer RT-PCR wurde eine erhöhte Expression des IGF-I-Rezeptors nachgewiesen, wohingegen die Cathepsin X-Defizienz auf IGF-II/M6P-Rezeptor (IGF-IIR/MPR) und den Kationen-abhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) keinen Einfluss hat. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD aus mind. 2 unabhängigen Experimenten. (A) PC-3. (B) LNCaP.

D.4.1.2 Phosphorylierung des IGF-I-Rezeptors

Ob die Zunahme der IGF-IR-Expression auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurde nun mittels Immunoblot untersucht. Dabei wurden auch die Aktivierungszustände des IGF-I-Rezeptors als Antwort auf eine IGF-I- bzw. IGF-II-Stimulation mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper genauer analysiert. Dazu wurden PC-3- oder LNCaP-Zellen in serumfreiem Medium kultiviert, um sie anschließend mit IGF-I bzw. IGF-II zu stimulieren und schließlich den phosphorylierten Rezeptor im Immunoblot nachzuweisen. Den Gesamtrezeptor betreffend, waren die Proteinmengen nach Cathepsin X-Knockdown sowohl in PC-3- als auch LNCaP-Zellen reproduzierbar erhöht (Abb. D.23A, D), was gut mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene übereinstimmt. Auch für den IGF-II-Rezeptor konnten die qRT-PCR-Daten auf Proteinebene bestätigt werden. Der Cathepsin X-Knockdown hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die IGF-IIR-Menge (Abb. D.23A, D). Hinsichtlich der Phosphorylierung des Rezeptors nach IGF-I-Stimulation ergab sich dagegen ein anderes Bild: der Knockdown führte zu einer deutlich verminderten Phosphorylierung von IGF-IR. Interessanterweise gilt dies jedoch nur für eine Stimulation mit IGF-I, während wir bei einer IGF-II-Stimulation keine nennenswerten Auswirkungen des Cathepsin X-Knockdown auf die IGF-IR-Phosphorylierung feststellen konnten.

Zwar scheint die absolute Menge des phosphorylierten Rezeptors nach IGF-II-Stimulation erhöht zu sein, jedoch bleibt zu beachten, dass auch die Gesamtmenge an IGF-IR erhöhte Werte aufwies. Setzt man die Mengen des phospho-Rezeptors mit der Gesamtrezeptormenge in Relation, so hat der Knockdown von Cathepsin X keine Auswirkungen auf die Stimulierbarkeit des IGF-I-Rezeptors durch IGF-II (Abb. D.23C, F).

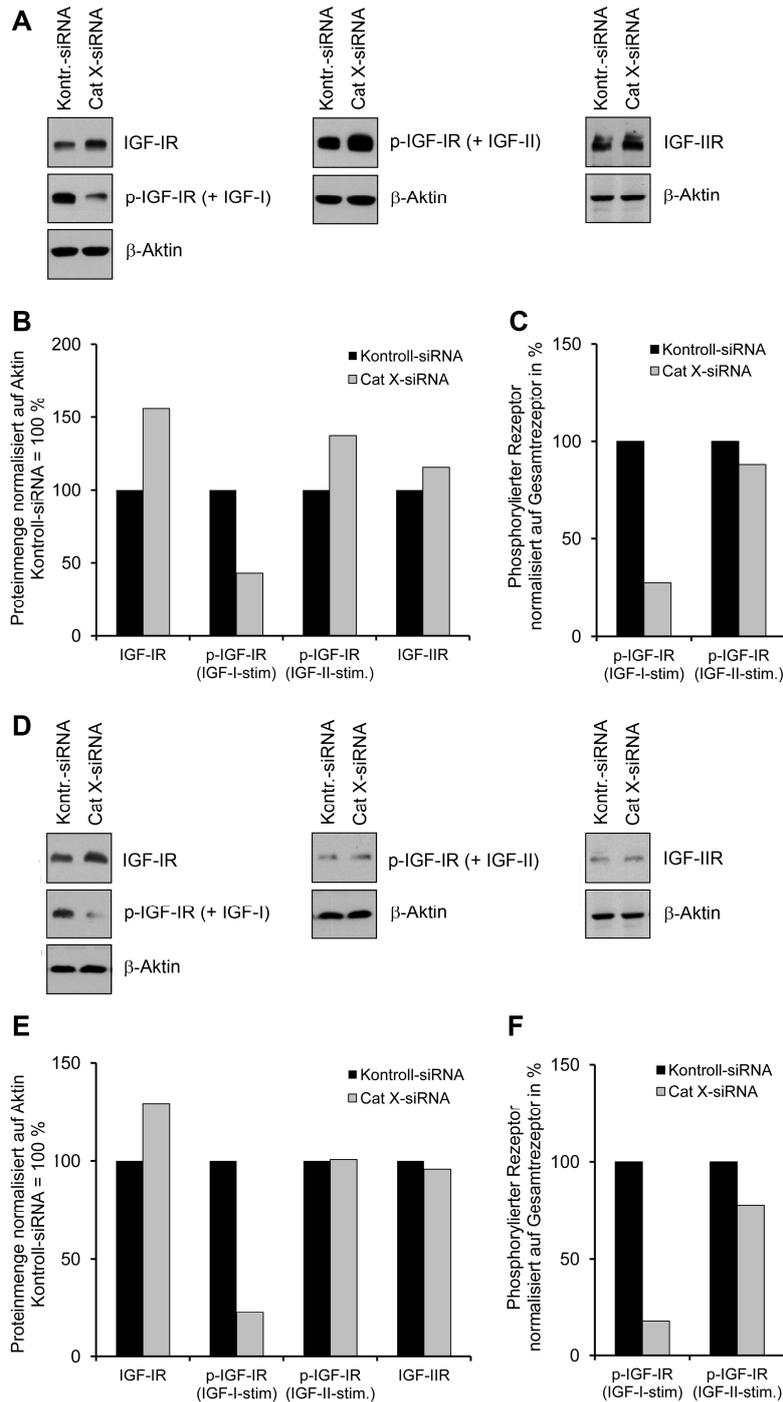


Abb. D.23: Phosphorylierung des IGF-I-Rezeptors in Prostatakarzinom-Zellen. (A) Der Knockdown von Cathepsin X führt in PC-3-Zellen zu erhöhten Gesamtproteinmengen des IGF-I-Rezeptors. Gleichzeitig ist die Stimulierbarkeit durch IGF-I deutlich herabgesetzt. Die Stimulierbarkeit durch IGF-II verändert sich in Relation zur Gesamtrezeptormenge dagegen nicht wesentlich, und auch die Menge des IGF-II-Rezeptors bleibt in etwa konstant. (B, C) Densitometrische Auswertung der Immunoblot-Ergebnisse aus (A). (D), (E) und (F) Immunoblots und densitometrische Analyse aus ähnlichen Experimenten mit LNCaP-Zellen.

D.4.1.3 Subzelluläre Lokalisation des IGF-IR

Um die Lokalisation und die veränderte Aktivierung des IGF-IR genauer zu untersuchen, führten wir Immunfluoreszenzfärbungen an PC-3-Zellen durch. Bereits im unstimulierten Zustand der Zellen verursachte die Cathepsin X-Defizienz eine veränderte Lokalisation des IGF-I-Rezeptors. Die intrazelluläre Verteilung des Rezeptors war bei Cathepsin X-defizienten Zellen homogener

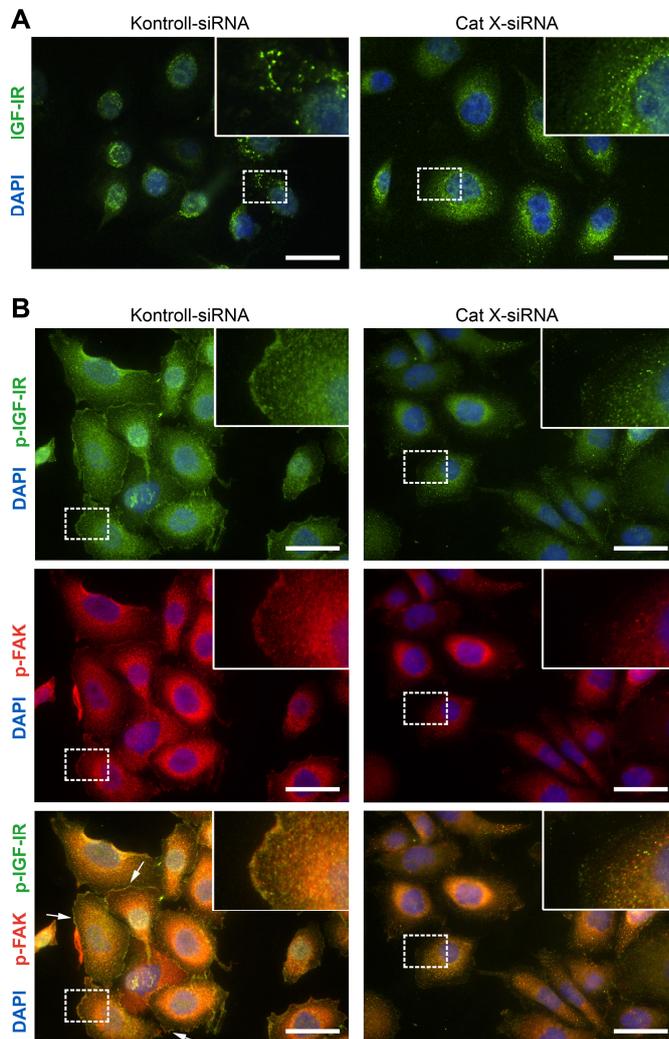


Abb. D.24: Subzelluläre Lokalisation des IGF-I-Rezeptors in PC-3-Zellen nach IGF-I-Stimulation. (A) Immunfluoreszenz-Färbungen von PC-3-Zellen unter normalen Kulturbedingungen. Auffällig ist die diffusere Verteilung der IGF-IR-enthaltenden Vesikel nach Cathepsin X-Knockdown. (B) In Folge einer IGF-I-Stimulation findet man in den Kontrollzellen eine Kolokalisation von p-IGF-IR und p-FAK entlang der Zellmembran (Pfeile), die in den Knockdown-Zellen nicht vorkommt. Der Größenstandard entspricht 25 µm.

und gleichmäßiger über das gesamte Zellvolumen verteilt, während die IGF-IR-positiven Strukturen der Kontrollzellen vorwiegend perinukleär auftraten und die einzelnen Vesikel größer erschienen (Abb. D.24A). Um die Rezeptoraktivierung zu untersuchen, wurden PC-3-Zellen für 20 Minuten mit IGF-I stimuliert. Es bestätigte sich, dass der Rezeptor nach Cathepsin X-Knockdown eine geringere Phosphorylierung nach Stimulation mit IGF-I aufweist (Abb. D.24B). Die markantesten Unterschiede traten entlang des Zellsaums auf: Während bei Kontrollzellen deutlich phospho-IGF-IR-positive Strukturen die Umrisse der Zellen markierten, trat dies bei Cathepsin X-defizienten Zellen nur sehr vereinzelt auf.

Da die Tyrosinkinase *focal adhesion kinase* (FAK) häufig mit aktiviertem IGF-IR assoziiert, wurden Doppelfärbungen für p-IGF-IR und p-FAK durchgeführt. Während die phosphorylierten Formen dieser beiden Proteine in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen eine ausgeprägte Kolokalisation im Bereich der Zellmembran zeigten (Pfeile), konnte dies bei Cathepsin X-defizienten Zellen nicht festgestellt werden.

Neben der Stimulation mit IGF-I wurde auch untersucht, ob Unterschiede in der Rezeptorverteilung als Antwort auf eine Stimulation mit IGF-II auftreten. Allerdings konnte bei dieser Versuchsanordnung kein markanter Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die Lokalisation von IGF-IR, phospho-IGF-IR oder FAK festgestellt werden (Abb. D.25).

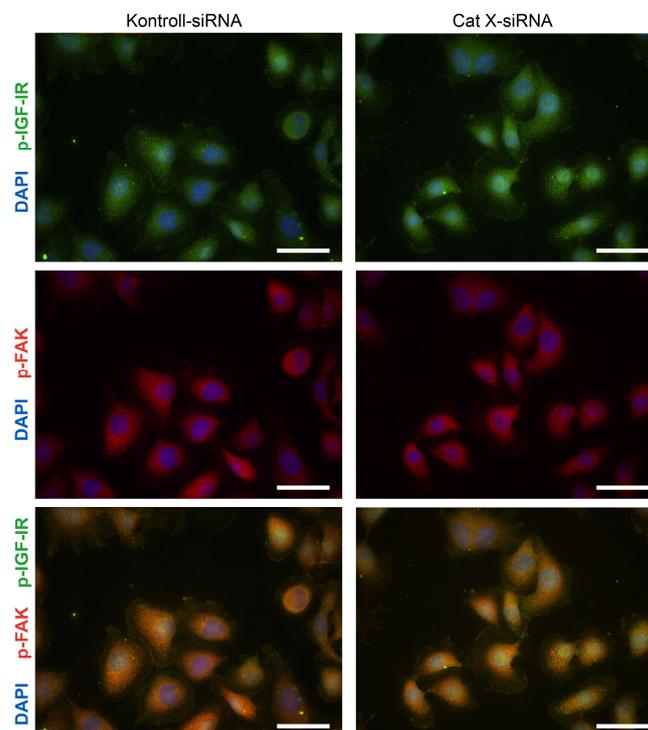


Abb. D.25: Subzelluläre Lokalisation des IGF-I-Rezeptors in PC-3-Zellen nach IGF-II-Stimulation. Die Stimulation von PC-3-Zellen mit IGF-II führt zu einer ähnlichen Verteilung und Menge des phosphorylierten IGF-I-Rezeptors, unabhängig davon, ob die Zellen zuvor mit Kontroll- oder Cathepsin X-siRNAs behandelt wurden. Der Größenstandard entspricht 25 μm .

D.4.1.4 Proliferation und Invasion nach Stimulation durch IGF-I und IGF-II

Wir konnten bisher zeigen, dass sich die Cathepsin X-Defizienz deutlich auf die IGF-I-Signalübertragung innerhalb der Zellen auswirkt. In den folgenden Experimenten sollte deshalb überprüft werden, inwiefern sich daraus Auswirkungen auf die IGF-induzierte Proliferation und Invasion dieser Zellen ergeben. Dazu wurden die zuvor transfizierten Zellen zunächst in serumfreiem Medium kultiviert und danach mit IGF-I oder IGF-II stimuliert. Danach wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen im CyQUANT Assay gemessen. Auch bei PC-3-Zellen zeigte sich, wie bereits bei Fibroblasten, dass Cathepsin-X-defiziente Zellen etwas schwächer proliferierten als die Kontrollen. Auffällig ist jedoch, dass in der Proliferation kein signifikanter Unterschied zwischen hungernden und mit IGF-I oder -II stimulierten Zellen messbar war (Abb. D.26A, B). Die Proliferation dieser Tumorzellen ist also weitgehend unabhängig vom Vorhandensein der Wachstumsfaktoren. Ein weiterer Versuch, die Empfindlichkeit von PC-3 für IGFs zu testen, erfolgte im Transwell-Experiment. Als Lockstoff diente in diesem Fall IGF-I bzw. IGF-II. Die Beschichtung der porösen Membranen erfolgte mit humaner extrazellulärer Matrix (EZM). Auch hier konnte wieder, wie schon in anderen Zelltypen, eine allgemeine Reduktion der

Invasivität nach Cathepsin X-Knockdown festgestellt werden (Abb. D.26 C, D). Wurde einer der beiden Wachstumsfaktoren als Lockstoff eingesetzt, reagierten die Zellen mit vermehrter Invasion. Allerdings konnten keine Hinweise auf eine durch Cathepsin X-Defizienz verursachte verminderte Stimulationsfähigkeit durch IGF-I oder IGF-II nachgewiesen werden. Die relative Stimulationsfähigkeit blieb völlig unbeeinflusst vom Fehlen von Cathepsin X.

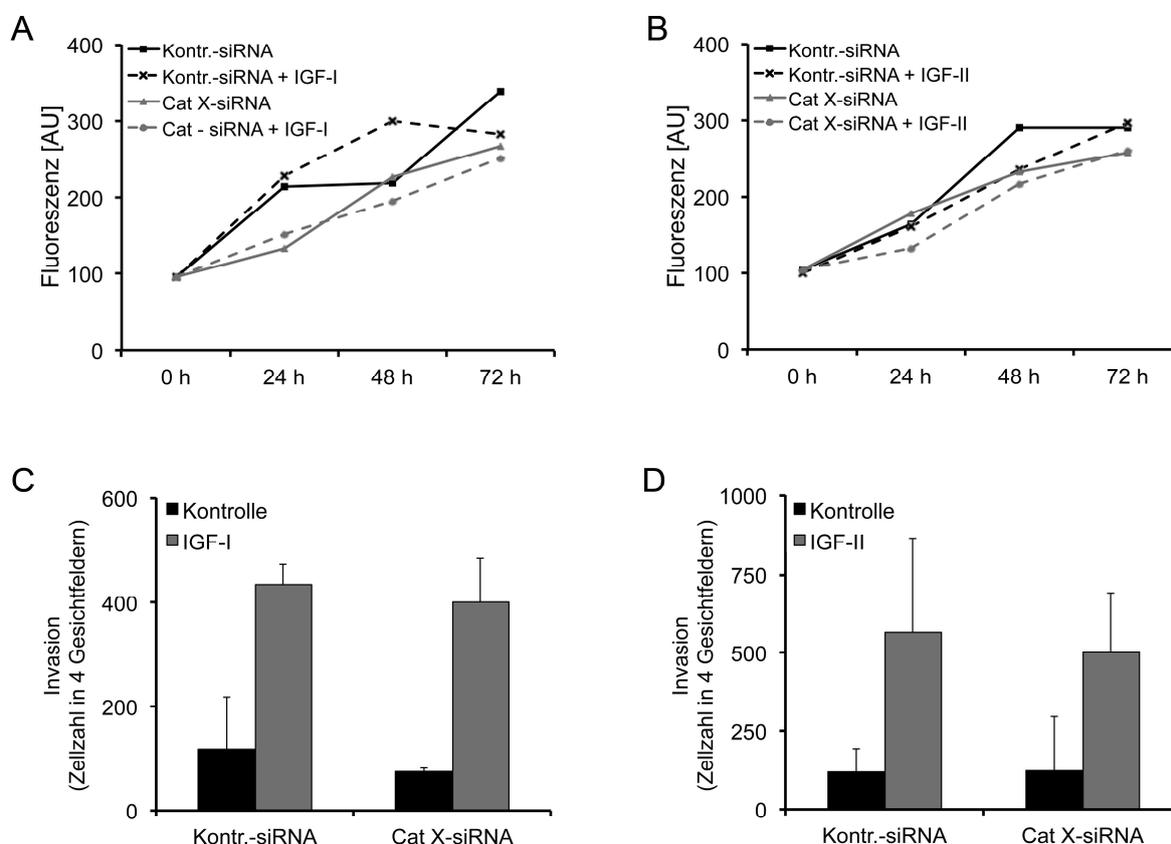


Abb. D.26: Der Einfluss von IGF-I und IGF-II auf die Proliferation und Invasion von PC-3-Zellen. (A, B) Die Zellen wurden in serumfreiem Medium über 3 Tage mit IGF-I oder IGF-II stimuliert. Anschließend wurde ein CyQuant-Assay zur Messung der Proliferation durchgeführt. Cathepsin X-siRNA-behandelte Prostatakarzinomzellen wuchsen etwas langsamer als die Kontrollen, die Wachstumsfaktoren erhöhten die Proliferation in beiden Fällen nicht. Dargestellt sind repräsentative Wachstumsverläufe aus 3 unabhängigen Experimenten (C, D) Invasion von PC-3-Zellen mit IGF-I bzw. -II als Lockstoff. Insgesamt war die Invasion der Cathepsin X-defizienten Zellen leicht erniedrigt. Beide Wachstumsfaktoren führten zu einer deutlichen Zunahme der invadierenden Zellen, welche von der Cathepsin X-Defizienz unbeeinflusst bleibt. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus Triplikat-Experimenten.

D.4.2 Einfluss der Cathepsin X-Downregulation auf die Aktivierung des MAPK-Signalwegs

Im vorangegangenen Abschnitt wurde dargestellt, dass die IGF-I-Signalweiterleitung über den IGF-I-Rezeptor bei Cathepsin X-defizienten PC-3-Zellen deutlich eingeschränkt ist. Eine der wichtigsten Signalkaskaden, in die das IGF-System mündet, ist der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signaltransduktionsweg. Genau genommen besteht dieses System aus 3

unterschiedlichen Wegen, deren zentrale Faktoren *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), *c-jun-N-terminal kinases* (JNK) bzw. p38 sind. Viele wichtige Funktionen wie Wachstum, Proliferation oder Differenzierung werden über diese Wege reguliert. Um zu untersuchen, ob Cathepsin X-Defizienz zu Veränderungen in diesem Signalsystem führt, wurden Proteinlysate von NHDF drei Tage nach Transfektion im Immunoblot auf Veränderungen einzelner in den Signalkaskaden beteiligter Proteine untersucht. Dabei wurden sowohl die Gesamtproteinmengen als auch die jeweiligen Aktivierungszustände einzelner Signalmoleküle erfasst.

Die Analysen zeigten eine deutliche Reduzierung des Anteils an phosphoryliertem, also aktiviertem ERK-Protein nach Behandlung mit Cathepsin X-spezifischen siRNAs, wohingegen die Gesamtmenge von ERK unverändert blieb (Abb. D.27). Dies veranlasste uns, weitere Kinasen aus dem MAPK-System zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass auch beim JNK-Weg eine differentiellen Aktivierung auftrat, jedoch verhielt es sich hier genau entgegengesetzt zu den Verhältnissen beim ERK-Weg: Der Cathepsin X-Knockdown sorgte für eine Zunahme des phosphorylierten JNK-Anteils. Die Gesamtmenge des JNK-Proteins wurde durch den Cathepsin X-Knockdown dagegen, wie auch Gesamt-ERK, nicht beeinflusst. Im Unterschied dazu führt die Cathepsin X-Defizienz zu keinen auffälligen Veränderungen bei p38/phospho-p38, welches zum dritten großen Arm der MAPK Signalkaskade gehört. Um nun die betroffenen Signalwege weiter einzugrenzen, wurden auch Komponenten *upstream* von ERK und JNK untersucht. Interessanterweise konnten bei keinem dieser Proteine Unterschiede zwischen Kontrolle und Cathepsin X-defizienten NHDF festgestellt werden. So blieben sowohl die regulatorische p85-Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) als auch die *p21-activated kinase* (PAK) und die *MAP kinase or ERK kinase* (MEK) unbeeinflusst. Ebenso ergaben sich keine Veränderungen in der gefundenen Proteinmenge der GTPase Ras.

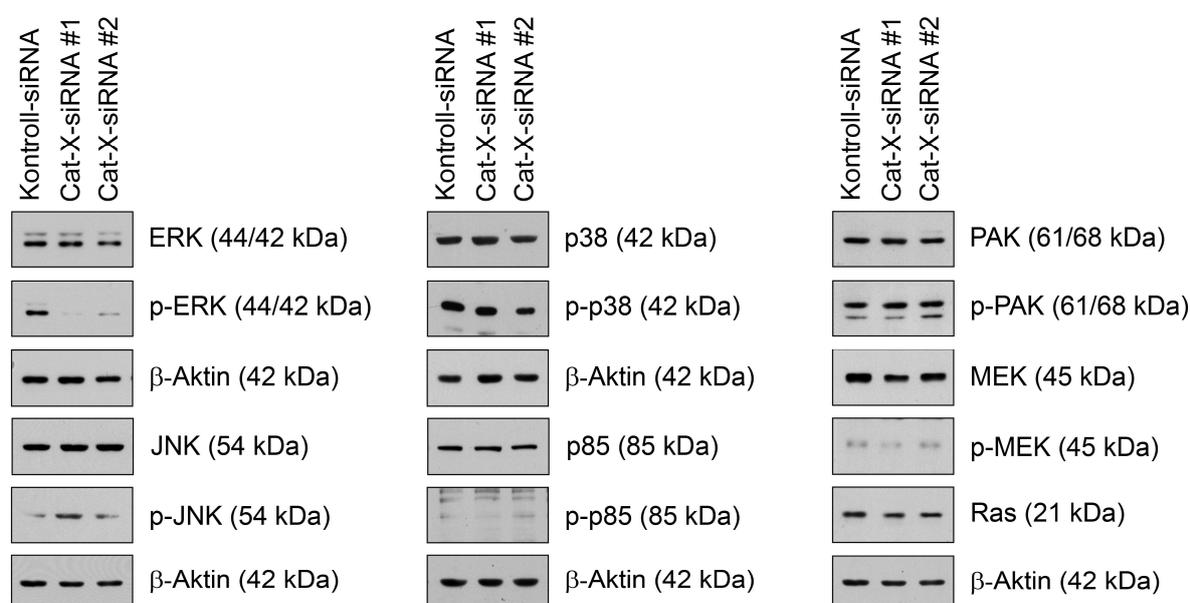


Abb. D.27: Einfluss der Cathepsin X-Defizienz auf die MAPK-Signalwege. Die Zellen wurden unter normalen Bedingungen kultiviert und die daraus gewonnenen Lysate mittels Immunoblot analysiert. Bei den Cathepsin X-siRNA-transfizierten NHDF kommt es zu einer klaren Reduktion an phospho-ERK, wohingegen die phosphorylierte Form von JNK in erhöhten Mengen vorkommt. Bei allen anderen untersuchten Komponenten der MAPK-Signalwege treten keine Veränderungen im Expressionsmuster auf.

D.4.3 Autophagiemechanismen bei Cathepsin X-defizienten Fibroblasten

Autophagie ist ein ubiquitärer kataboler Prozess für die Degradation cytoplasmatischer Komponenten über den lysosomalen Abbauweg, der auch im Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz steht. So werden zum einen Autophagie-assoziierte Gene während der Seneszenz heraufreguliert, andererseits führt eine Inhibition der Autophagie zu einer verzögerten Seneszenz (Sasaki et al., 2010). Hinzu kommt, dass die Geschwindigkeit des autophagischen Flusses in Neuronen durch IGF-I positiv beeinflusst wird (Bains et al., 2009; Bains et al., 2011). Die zuvor festgestellten Auswirkungen einer Cathepsin X-Defizienz auf den IGF-I-Rezeptor könnten demnach auch auf die Autophagiemechanismen wirken. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Cathepsin L-Defizienz in MEF-Zellen zu vergrößerten Autophagolysosomen aufgrund einer beeinträchtigten lysosomalen Proteindegradation führt (Dennemarker et al., 2010). In den folgenden Untersuchungen sollte nun aufgeklärt werden, ob auch die Cathepsin X-Defizienz einen Einfluss auf die Autophagie hat.

D.4.3.1 Markierung von Autophagosomen mittels GFP-LC3B

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 isoform b (LC3B) ist ein wichtiger Faktor in autophagischen Prozessen. Unter normalen Bedingungen befindet sich dieses Protein im Cytosol, mit beginnender Autophagie wird jedoch Phosphatidylethanolamin über eine Amid-Bindung an LC3B angehängt, was dazu führt, dass LC3B sich an die Phagosomen-Membranen anlagert. Mit Hilfe fluoreszenter Formen von LC3B lässt sich somit die Bildung von Autophagosomen in der Zelle sichtbar machen und der Prozess verfolgen.

NHDF Zellen wurden zunächst Cathepsin X-spezifischen oder Kontroll-siRNAs transfiziert und anschließend unter Verwendung des *insect Baculovirus with a Mammalian promoter* (BacMam)-Systems mit einer GFP-markierten Version von LC3B transduziert. Schließlich wurde die Verteilung des Fluoreszenz-markierten Proteins innerhalb der Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In Abb. D.28 ist zu erkennen, dass GFP-LC3B unter Standard-Wachstumsbedingungen hauptsächlich cytoplasmatisch auftrat, während beim Hungern verstärkt LC3B-positive Vesikel auftraten. Schwerwiegende Unterschiede zwischen Cathepsin-X-defizienten Zellen und Kontrollzellen konnten dabei nicht beobachtet werden. Der Knockdown hatte lediglich einen geringen Einfluss auf die Größe der vorgefundenen Autophagosomen innerhalb der Fibroblasten. So wiesen LC3B-positive Vesikel in Cathepsin X-defizienten Zellen vor allem im Vollmedium eine leicht verringerte Größe auf. Unter Hunger-Bedingungen verringerten sich diese nur dezenten Unterschiede noch weiter. Es konnten zudem keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtfluoreszenz festgestellt werden, was dafür spricht, dass der autophagische Fluss, also die Geschwindigkeit der Autophagie, durch Cathepsin X-Defizienz in NHDF nicht beeinflusst wird.

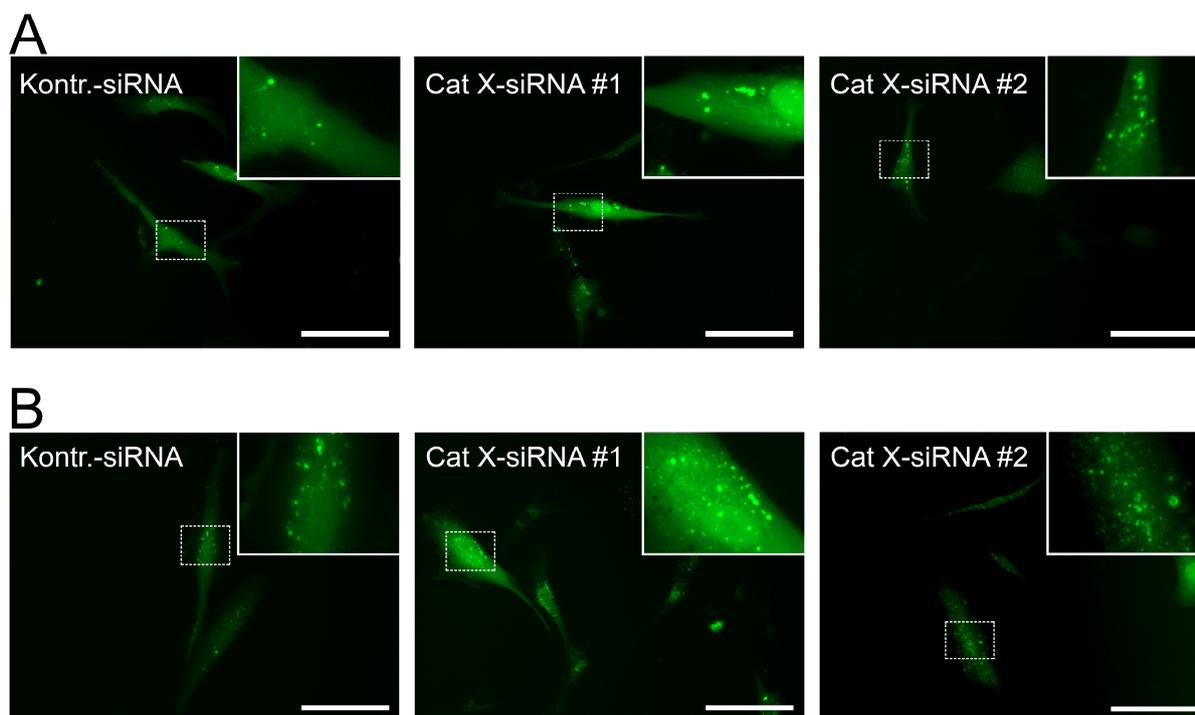


Abb. D.28: Bildung von Autophagosomen in NHDF-Zellen. In NHDF wurde mittels Baculovirus-Transduktion die Expression einer fluoreszenten Form von LC3B angeregt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es konnten keine relevanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Cathepsin X-Knockdown festgestellt werden. (A) Kultivierung in Vollmedium. (B) Nach 20 h in serumfreiem Medium enthalten die Fibroblasten vermehrt LC3B-positive Autophagosomen im Vergleich zu Zellen im Vollmedium. Der Größenstandard entspricht 100 μm .

D.4.3.2 Markierung saurer Vesikel mittels LysoTracker®

In MEF aus Cathepsin L-Knockout-Mäusen wurde eine Anhäufung saurer Vesikel beobachtet (Dennemarker et al., 2010), was auf einen beeinträchtigten Umsatz von Autolysosomen schließen lässt. Um dies in Cathepsin X-defizienten Fibroblasten zu untersuchen, wurden diese mit dem fluoreszenten Farbstoff LysoTracker® gefärbt, der bevorzugt in sauren Kompartimenten akkumuliert. Die Behandlung mit Cathepsin X-siRNAs verursachte dabei einen Fluoreszenzanstieg im Vergleich zur Kontrolle, dessen Stärke jedoch zwischen den unterschiedlichen siRNAs stark variierte (Abb. D.29A, B). Während sich die Fluoreszenz durch siRNA #1 nur um etwa 15-29 % erhöhte, verursachte siRNA #2 einen Anstieg um 90-94 %.

Zur weiteren Abklärung dieses Befunds wurden zusätzlich die Autophagie-Marker *early endosomal antigen 1* (EEA1) und *lysosomal-associated membrane protein 1* (Lamp1) mittels Immunoblot analysiert. Während EEA1 im Wesentlichen während der Initiationsphase der Autophagie von Bedeutung ist, wird Lamp1 erst in einem späteren Abschnitt der Autophagie, nach der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen, relevant. Dabei wurden für EEA1 keine Veränderungen in Cathepsin X-defizienten Fibroblasten festgestellt. Dagegen war die gefundene Proteinmenge von Lamp1 in diesen Zellen deutlich erhöht (Abb. D.29C). In Kombination mit der erhöhten LysoTracker-Fluoreszenz lässt dies auf eine erhöhte Zahl an (Auto-)Lysosomen schließen.

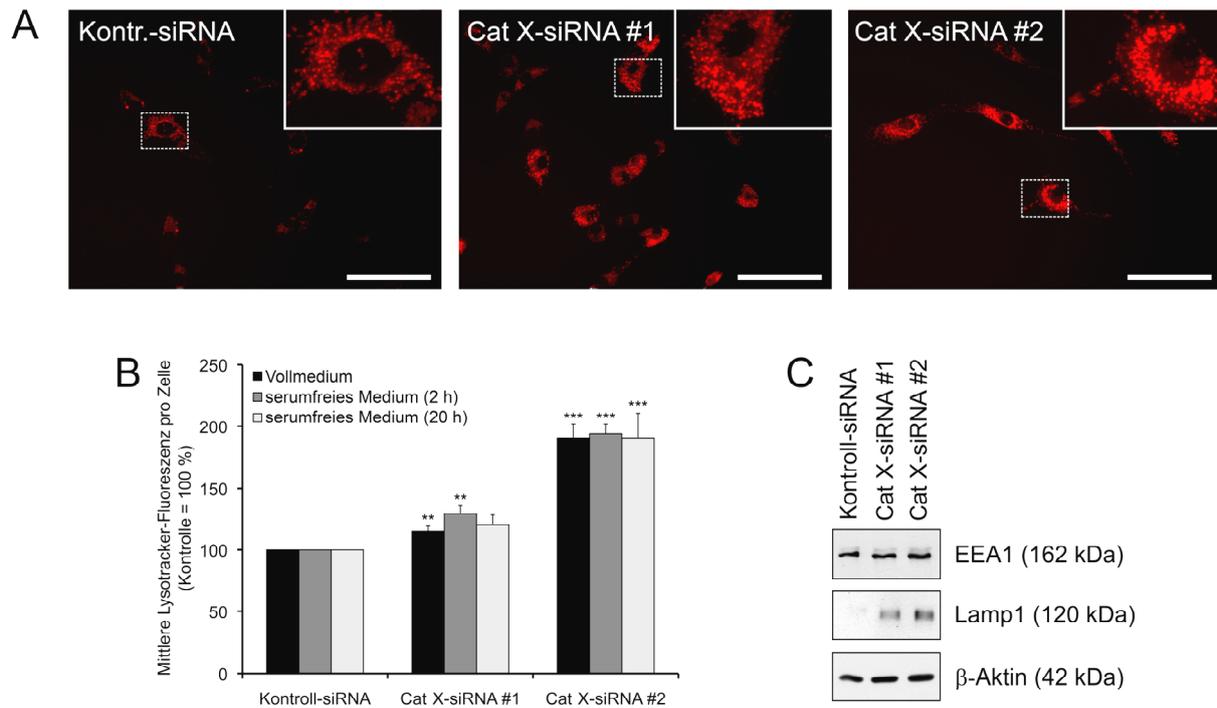


Abb. D.29: Zunahme des lysosomalen Volumens sowie des lysosomalen Membranproteins Lamp1 in Cathepsin X-siRNA-behandelten NHDF. (A, B) Die Zellen wurden mit dem LysoTracker-Reagenz inkubiert, um saure Bereiche innerhalb der Zellen anzufärben. Die Cathepsin X-defizienten NHDF wiesen eine erhöhte LysoTracker-Fluoreszenz auf, wobei deutliche Unterschiede in der Stärke des Anstiegs zwischen beiden Cathepsin X-siRNAs auftraten. (A) Darstellung saurer Kompartimente mittels LysoTracker während einer Kultivierung im Vollmedium. Der Größenstandard entspricht 100 μm . (B) Durchflusszytometrische Auswertung der LysoTracker-Färbung in Vollmedium und nach 2 bzw. 20 Stunden in serumfreiem Medium. (C) Keine Veränderung beim endosomalen Marker EEA1, jedoch Zunahme der Proteinmenge von Lamp1 nach Cathepsin X-siRNA-Transfektion.

E Diskussion

Eine der Hauptaufgaben der lysosomalen Cathepsine ist es, fehlerhafte oder überschüssige Proteine innerhalb der Lysosomen abzubauen, damit deren Bestandteile anschließend von der Zelle wiederverwertet werden können. Bis vor wenigen Jahren schien dies die alleinige Funktion dieser Gruppe von Enzymen zu sein. Neben der Aufklärung weiterer physiologischer Aufgaben bestimmter Cathepsine häuften sich jedoch auch Befunde, die auf mögliche weitere Funktionen dieser Proteasen an pathologischen Prozessen schließen ließen. So wurde in vielen Studien über erhöhte Expression, Aktivität und extrazelluläre Lokalisation einzelner Cathepsine bei unterschiedlichen Tumorarten berichtet (Jedezsko and Sloane, 2004; Nägler et al., 2004). Nun stellen wir uns die Frage, welche Vorteile sich für die Tumorzellen durch erhöhte Cathepsin-expression oder -aktivität bzw. -sekretion ergeben können.

E.1 Beteiligung von Cathepsinen an invasiven Prozessen

Eine Voraussetzung dafür, dass Tumorzellen invasiv werden und durch das Gewebe wandern können, ist der Abbau extrazellulärer Matrix (EZM) (Sloane et al., 2006a). Es ist allgemein bekannt, dass Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Serinproteasen von invasiven Tumorzellen oder Tumor-assoziierten Zellen sezerniert werden und die Tumorprogression unterstützen, unter anderem durch Degradation der EZM (Sloane et al., 2006a). Cathepsinen wurde dieses Potential zunächst nicht zugetraut, da es sich hierbei um vorwiegend intrazellulär vorkommende Enzyme handelt. Allmählich stellte sich jedoch heraus, dass einige Cathepsine maßgeblich an invasiven Prozessen beteiligt sind. Beispielsweise führte eine Downregulation von Cathepsin B mittels Antisense-RNA zu verminderter Invasion in Matrigel-Assays (Krueger et al., 1999), während andererseits eine Überexpression von Cathepsin B die Invasionsfähigkeit einer Melanomzelllinie um das 3- bis 5-fache erhöhte (Szpadarska and Frankfater, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Osteosarkomzellen nach einem Knockdown von Cathepsin L erzielt (Krueger et al., 2001). Eine Überexpression von Cathepsin X führte umgekehrt zu erhöhter Invasion und Metastasierung von hepatozellulären Karzinomzellen (Wang et al., 2011). Auch unsere eigenen Transwell-Versuche bestätigten eine Verminderung der Invasion nach Downregulation eines der Cathepsine B, L oder X in Prostatakarzinomzellen. Für die Interpretation dieser Ergebnisse muss man zwischen den unterschiedlichen Cathepsinen differenzieren. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die jeweilige Protease, neben der möglichen proteolytischen Aktivierung weiterer invasionsfördernder Faktoren, aktiv und direkt am Abbau der EZM teilnimmt. In Anbetracht unserer Ergebnisse ist dies für Cathepsin L in der Tat sehr wahrscheinlich, da im Proteolyse-Experiment mit fluorogenem Kollagen I, Kollagen IV sowie bovinem Serumalbumin (BSA) alle drei getesteten Substrate sehr gut gespalten werden konnten. Obschon es sich hierbei um ein artifizielles System handelt, erscheint es möglich, dass Cathepsin L aufgrund seiner endoproteolytischen Aktivität auch *in vivo* direkt am Abbau der EZM beteiligt

ist. Durch Cathepsin B dagegen wurden die verwendeten Substrate nur sehr unzureichend degradiert, und für Cathepsin X war praktisch keine relevante Spaltung zu beobachten. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei Cathepsin X um eine reine Carboxypeptidase handelt (Nägler et al., 1999; Therrien et al., 2001) und die Abspaltung einzelner Aminosäuren am C-terminalen Ende des Substrats nicht ausreicht, um dessen Abbau maßgeblich umzusetzen. Cathepsin B besitzt zwar sowohl endo- als auch exoproteolytische Aktivität, aufgrund des sogenannten *occluding loops*, der Substraten den Zugang zum aktiven Zentrum erschwert, ist die Aktivität als Endoprotease im Vergleich zu Cathepsin L jedoch sehr schwach ausgeprägt (Illy et al., 1997; Nägler et al., 1997; Krupa et al., 2002). Zieht man dies alles in Betracht, ist eine direkte Beteiligung von Cathepsin B und vor allem von Cathepsin X an EZM-Abbauprozessen sehr unwahrscheinlich, und ihr Einfluss auf die Invasion/Migration muss demnach über andere Mechanismen stattfinden. Einer dieser alternativen Mechanismen ist die Umgehung der zellulären Seneszenz, was in der vorliegenden Arbeit im Speziellen für Cathepsin X genauer untersucht wurde.

E.2 Zelluläre Modellsysteme

Der Einfluss von Cathepsinen auf die Invasion/Migration wurde bereits in den unterschiedlichsten Tumorzelllinien analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass einige Cathepsine begünstigend auf das Invasionsverhalten der Zellen wirken, darunter auch Cathepsin X. Um dies auch in untransformierten Zellen zu untersuchen, kamen in der vorliegenden Studie Fibroblasten zum Einsatz, deren Cathepsin X-Expression auf zwei unterschiedliche Arten unterdrückt wurde. Humane NHDF wurden mit gegen Cathepsin X-gerichteten siRNAs transient transfiziert, wohingegen die Expression in den murinen MEF durch einen kompletten Knockout des Cathepsin X-Gens abgeschaltet wurde (Sevenich et al., 2010).

Die siRNA-induzierte Downregulation von Cathepsin X in NHDF zeigte unterschiedliche Kinetiken für die Reduktion der mRNA- bzw. Protein-Mengen. Durch den schnellen Stoffwechsel dieser Zellen mit einer Teilungsrate unter 24 h war die maximale Effizienz des Knockdowns auf mRNA-Ebene bereits nach 24 Stunden erreicht und sank im weiteren Verlauf kontinuierlich ab, während auf Proteinebene die größte Knockdown-Effizienz an Tag 4 und 5 eintrat. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, da der Proteinumsatz aufgrund der höheren Halbwertszeit von Proteinen deutlich langsamer als der Umsatz der mRNA abläuft.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit Fibroblasten zweier unterschiedlicher Spezies verwendet wurden, deren Cathepsin X-Expression mittels verschiedener Methoden geblockt wurde, konnten wir in beiden Fällen eine Heraufregulation der Transkriptmengen für Cathepsin B und, sogar noch deutlicher, für Cathepsin L beobachten. Die Ursache hierfür ist vermutlich in kompensatorischen Mechanismen zu suchen, da eine große Redundanz innerhalb der Cathepsine herrscht und somit das Fehlen eines Cathepsins häufig durch erhöhte Expression

anderer Mitglieder dieser Gruppe zumindest teilweise ausgeglichen werden kann (Nägler and Menard, 2003). Dass die fehlenden Cathepsin X-Funktionen in Fibroblasten und Prostatakarzinomzellen jedoch nur unvollständig ausgeglichen werden können, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Cathepsin X-Defizienz nicht nur die Invasions-/Migrationsfähigkeit von Tumorzellen negativ beeinflusst, sondern dass dies auch für untransformierte Zelltypen gelten kann, da sowohl humane als auch murine Cathepsin X-defiziente Fibroblasten durch ein vermindertes Invasions-/Migrationsverhalten in Transwell- sowie Scratch-Assays gekennzeichnet sind. Bei den MEF fiel zusätzlich auf, dass das Migrationsvermögen von Passage 5 bis Passage 7 stetig abnahm. Die Unterschiede der Cathepsin X^{-/-}-MEF zum Wildtyp scheinen sich mit der Zeit weiter zu verstärken. In zusätzlichen Versuchen wurden auch Prostatakarzinomzellen der Linien PC-3 und LNCaP verglichen, die ebenfalls eine verringerte Invasion/Migration unter Einfluss von Cathepsin X-siRNAs aufwiesen. Es liegt hier offenbar ein Phänomen vor, das speziesübergreifend ist und sowohl für untransformierte Zellen (Fibroblasten) also auch für entartete Zellen gilt.

Die vergrößerte, abgeflachte Gestalt der Cathepsin X-defizienten Zellen gab uns den entscheidenden Hinweis, in diesem Zusammenhang nach Veränderungen im Ablauf der zellulären Seneszenz zu suchen. Die primären, physiologischen Fibroblasten eignen sich für derartige Studien besser als Tumorzellen, da bei letzteren die zellulären Regelmechanismen bereits über verschiedenste Wege umgangen werden bzw. verändert sind. Dies würde Untersuchungen hinsichtlich der Seneszenz, die ja der Tumorentstehung entgegenwirken soll, erschweren. Der Vergleich mit Tumorzellen zeigt dennoch die physiologische Relevanz unserer Erkenntnisse, da diese Zellen sich in ihren untersuchten Eigenschaften infolge der Cathepsin X-Defizienz sehr ähnlich wie die primären Fibroblasten verhielten. Desweiteren erwiesen sich PC-3- und LNCaP-Prostatakarzinomzellen aufgrund ihrer im Vergleich zu Fibroblasten höheren Expression der IGF-Rezeptoren als äußerst nützlich für die weiterführenden Studien zur Aufklärung des Mechanismus der durch Cathepsin X-Defizienz ausgelösten Seneszenz.

E.3 Auswirkungen der Cathepsin X-Defizienz auf die zelluläre Seneszenz

E.3.1 Morphologie

Das wohl markanteste Kennzeichen seneszenten Zellen ist ihre vergrößerte und abgeflachte Morphologie (Hayflick and Moorhead, 1961). Diese Gestalt ist auch bei Fibroblasten zu erkennen, deren Cathepsin-X-Expression entweder durch siRNAs oder durch einen konstitutiven Gen-Knockout unterdrückt wird. Dabei betrug die Zunahme des Zelldurchmessers unter den

getesteten Bedingungen mindestens 30 %. Dieser Größenzuwachs ist auch die plausibelste Erklärung für die beobachtete Verminderung der Invasions-/Migrationsfähigkeit in Transwell-Experimenten, da die Mobilität durch die poröse Transwell-Membran unter anderem auch entscheidend von der Größe der Zellen abhängt. Bei diesen Experimenten war zu beachten, dass je nach Versuchsdesign auch die Proliferation einen gewissen Effekt auf die Zahl der letztendlich als migriert gewerteten und gezählten Zellen haben kann. Dies liegt daran, dass sich bereits durch die Membran gewanderte Zellen bei langen Migrationszeiten erneut teilen und somit die Ergebnisse in Bezug auf die reine Invasion verfälschen können. Dieser Faktor kann jedoch vernachlässigt werden, indem die angesetzten Migrationszeiten möglichst kurz gehalten werden. In unserem Fall betragen die Inkubationszeiten im Transwell-Experiment lediglich 6 Stunden für MEF und 15 Stunden für NHDF bzw. PC-3, weshalb ein wesentlicher Einfluss der Proliferation auf die erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden kann. Demnach bleibt die Größenzunahme als Hauptursache für die verminderte Invasionsfähigkeit im Transwell-Experiment am wahrscheinlichsten.

E.3.2 Proliferation und Zellzyklus

Zusätzlich zu ihrer veränderten Morphologie zeichnen sich seneszente Zellen in der Regel durch einen permanenten Wachstumsstopp aus. Mit CyQUANT- und BrdU-Assays wurde auch in Cathepsin X-defizienten Fibroblastenkulturen eine deutliche Verlangsamung der Proliferation nachgewiesen. Dieser Einfluss auf das Zellteilungsverhalten gilt nicht ausschließlich für Cathepsin X, sondern es scheint sich hier um ein allgemeines Phänomen bei den lysosomalen Cathepsinen zu handeln, da auf RNA-Interferenz (RNAi) basierende Studien mit den Targets Cathepsin B (Nalla et al., 2010) sowie Cathepsin L (Wille et al., 2002) in Prostatakarzinomzellen bzw. in Lungenepithelzellen ebenfalls eine verminderte Proliferation nachwiesen. Zudem bestand in histochemisch analysierten Proben von Blasenkrebspatienten eine deutliche Korrelation zwischen Cathepsin L und dem Proliferationsmarker Ki-67 (Yan et al., 2010). Mehrere Cathepsine haben demnach einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation. Jedoch konnte bisher noch nicht geklärt werden, auf welchem zellulären Mechanismus dieser Effekt beruht. Bereits Wille et al. vermuteten, dass die pro-proliferative Wirkung von Cathepsin L womöglich auf eine Interaktion mit dem IGF-II-Rezeptor zurückzuführen sei, ohne aber entsprechende Daten für diese Hypothese zu liefern (Wille et al., 2002). Zumindest für Cathepsin X konnte in unseren eigenen Versuchen gezeigt werden, dass der Knockdown tatsächlich deutliche Auswirkungen auf dieses System hat (s. Kapitel E.4).

Um den Proliferationsdefekt Cathepsin X-defizienter Fibroblasten genauer zu charakterisieren, wurden mit diesen Zellen Zellzyklusanalysen durchgeführt. Die Untersuchung der Zellzyklusphasen anhand der DNA-Histogramme ergab für Cathepsin X-defiziente Zellen einen partiellen Arrest in G₁, verbunden mit einer leicht verringerten DNA-Syntheserate. Diese dezenten Unterschiede können den starken Abfall in der Proliferationsrate allerdings nur zum

Teil erklären. Die Ergebnisse aus den BrdU-Pulse-Chase-Experimenten deuten darauf hin, dass eine allgemeine Verlangsamung des Zellzyklus mit einem verzögerten Eintritt in die G₁-Phase eine wichtige Ursache für das beobachtete verlangsamte Zellwachstum ist. Dies mag zunächst verwundern, da im Zusammenhang mit Seneszenz häufig von einem kompletten Zellzyklusstopp, meist in G₁, berichtet wird. Jedoch müssen Induktion der Seneszenz und endgültiger Wachstumsarrest nicht unbedingt gemeinsam und zeitgleich eintreten (Katakura et al., 1999; Demidenko and Blagosklonny, 2008). Vielmehr scheint es, als ob diese beiden Vorgänge unabhängig voneinander reguliert werden und somit auch zeitlich versetzt ablaufen können. Sogar das Vorhandensein von DNA-Synthese scheint unter bestimmten Bedingungen mit der Aufrechterhaltung des seneszenten Zellzyklusarrests vereinbar zu sein (Beausejour et al., 2003). Durch die Heterogenität primärer Zellkulturen kann man zudem davon ausgehen, dass nicht alle Zellen einer Kultur in gleichem Maße und mit gleichen Kinetiken auf die Cathepsin X-Defizienz reagieren, was zu einer breiten Streuung der Ergebnisse auf Einzelzellebene führt und somit zu „unschärferen“ Unterschieden zwischen Experiment und Kontrolle. Hinzu kommt bei den transient transfizierten Zellen, dass sich einzelne Zellen stark in der Menge der aufgenommenen siRNA-Moleküle unterscheiden können, wodurch die Heterogenität der gesamten Kultur noch weiter erhöht wird.

Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass das verminderte Wachstum der Cathepsin-X-defizienten Kulturen nicht auf den Verlust von Zellen aufgrund einer verstärkt ablaufenden Apoptose zurückzuführen ist. Unter den getesteten Bedingungen konnten weder signifikante Unterschiede in der Induzierbarkeit der Apoptose festgestellt werden noch war die Apoptoseaktivität unter basalen Bedingungen unterschiedlich. Zwar wird Seneszenz häufig mit einer gewissen Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion durch bestimmte Stimuli in Verbindung gebracht (Ryu et al., 2007; Kim et al., 2011), jedoch existieren auch entgegengerichtete Berichte, wonach Mechanismen, die zu zellulärer Seneszenz führen, mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Apoptosestimuli einhergehen können (Nogueira et al., 2008; Zhao et al., 2011). Der Zusammenhang zwischen Apoptose und Seneszenz ist somit nicht eindeutig und zudem abhängig vom Zelltyp sowie von weiteren noch nicht näher bestimmten Faktoren.

E.3.3 Expression Seneszenz-assoziiierter Gene

Senescente Zellen weisen im Vergleich zu „jungen“ Zellen ein verändertes Expressionsmuster verschiedener Gene auf. Dabei ist keiner dieser Marker absolut spezifisch, weshalb für eine klare Aussage stets mehrere Marker parallel untersucht werden müssen. Ein relativ zuverlässiger und anerkannter Marker der zellulären Seneszenz ist die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal), deren Aktivität bzw. Menge im seneszenten Zustand in den Zellen stark erhöht ist. Es handelt sich bei der SA- β -Gal nicht um ein eigenes Enzym, sondern sie ist mit der „gewöhnlichen“ lysosomalen β -Galaktosidase identisch (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000; Lee

et al., 2006). Die Erhöhung der β -Gal-Aktivität scheint dabei nicht Ursache, sondern eher Folge der zellulären Seneszenz zu sein, da Lysosomen im Laufe der Zellalterung sowohl in ihrer Menge als auch in ihrer Aktivität zunehmen (Robbins et al., 1970a; Cristofalo and Kabakjian, 1975; Gerland et al., 2003). Dieser hier beschriebene Phänotyp mit erhöhter SA- β -Gal-Färbung der Zellen konnte auch bei Cathepsin X-defizienten NHDF beobachtet werden, während der *Rescue* mit exogenem Cathepsin X die Erhöhung der SA- β -Gal-Aktivität erwartungsgemäß unterdrückte. Dies belegt eindeutig, dass die Zunahme der SA- β -Gal-Aktivität durch eine reduzierte Cathepsin X-Expression ausgelöst wird und nicht durch unspezifische Effekte aufgrund der siRNA-Transfektion oder des Knockouts. Da die Zellen der Cathepsin X^{-/-}-Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyp-Fibroblasten eine β -geo Reporter-kassette mit dem für β -Galaktosidase kodierenden LacZ-Gen enthalten (Sevenich et al., 2010), wurde hier auf eine Untersuchung der SA- β -Gal-Aktivität verzichtet. Interessant ist auch unser Befund, dass der Verlust von Cathepsin X in humanen und murinen Fibroblasten zu einer Erhöhung der Expression der Cathepsine B und L führt. Neben der Möglichkeit der kompensatorischen Heraufregulation anderer Cathepsine zum Ausgleich des Cathepsin X-Mangels ist noch eine weitere Ursache für die Steigerung der Cathepsin B und L-Expression denkbar: Aufgrund der Vergrößerung der Lysosomen während der Seneszenz würde man gleichzeitig auch eine Mengenzunahme der lysosomalen Cathepsine erwarten, ähnlich wie dies bei der SA- β -Gal der Fall ist. Studien zu diesem Thema wurden bislang noch nicht veröffentlicht, jedoch wurde gezeigt, dass die Aktivität der Cathepsine B und L in menschlichen Blutproben mit dem Alter der Probanden zunimmt (Wyczalkowska-Tomasik and Paczek, 2012). Ähnlich verhält es sich mit Cathepsin X, dessen Menge innerhalb des zentralen Nervensystems der Maus mit dem Altern ebenfalls ansteigt (Wendt et al., 2007).

Im Zuge der zellulären Seneszenz wird auch eine Reihe weiterer Gene heraufreguliert. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Komponenten des p53-p21- und des p16-pRb-Wegs, die im seneszenten Zustand je nach Zelltyp und Spezies jeweils einzeln oder gemeinsam aktiviert sein können (Campisi, 2005; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Auf mRNA-Ebene wurde bei Cathepsin X-defizienten Fibroblasten eine leichte Heraufregulation von p16 gemessen. Für p53 und p21, welche beide zur p53-Achse zählen, war dieser Effekt in beiden zellulären Systemen sogar noch deutlicher. Zusätzlich war jeweils auch die Expression von Caveolin-1 erhöht. Für dieses Membranprotein wurde gezeigt, dass eine Überexpression in murinen Fibroblasten zelluläre Seneszenz über den p53-p21-Weg induzieren kann (Galbiati et al., 2001; Bartholomew et al., 2009). Da auch im Immunoblot neben Caveolin-1 mit p21 bzw. p53 ausschließlich Proteine des p53-Weges verstärkt detektiert wurden, deutet dies darauf hin, dass die durch Cathepsin X-Defizienz induzierte Seneszenz sowohl bei humanen als auch bei murinen Zellen primär von diesem Weg abhängig ist.

Dabei ist zu beachten, dass die unterschiedlichen Mechanismen, die zur zellulären Seneszenz führen und diese aufrecht erhalten, bisher nur teilweise verstanden sind. Beispielsweise ist der senescente Phänotyp in seneszenten murinen Zellen durch Inaktivierung von pRb oder p53 umkehrbar und dadurch ein Wiedereintritt in den Zellzyklus möglich (Dirac and Bernards, 2003; Sage et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine nicht nur benötigt werden, um die

Seneszenz einzuleiten, sondern auch, um diesen Status dauerhaft aufrechtzuerhalten. In humanen Zellen dagegen bleibt eine vollständig ausgereifte Seneszenz trotz Inaktivierung von pRb und p53 meist irreversibel (Dai and Enders, 2000; Beausejour et al., 2003). Andererseits scheint hier zumindest für p53 auch eine Zelltypabhängigkeit zu bestehen, da beispielsweise die Seneszenz in BJ-Fibroblasten durch p53-Inaktivierung aufgehoben werden kann, in WI-38-Fibroblasten dagegen nicht (Beausejour et al., 2003). Zudem gibt es Hinweise über weitere Seneszenzmechanismen, die weder p53- noch pRb-p16-abhängig sind. So löst der Proteasom-Inhibitor MLN4924 einen seneszenten Phänotyp aus, der zwar abhängig von p21 ist, bei dem aber weder p53 noch pRb-p16 eine Rolle spielen (Jia et al., 2011). Andererseits fand eine weitere Arbeitsgruppe unter anderen experimentellen Bedingungen, dass p53 in diesem Zusammenhang dennoch für die Seneszenz relevant ist, wenn auch in geringerem Maße als p21 (Lin et al., 2010). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Wege zur Seneszenz noch unvollständig aufgeklärt und verstanden sind.

Es bleibt somit festzuhalten, dass es bei der durch Cathepsin X-Defizienz ausgelösten Seneszenz zu einem typischen Expressionsmuster Seneszenz-assoziiierter Gene kommt, die genauen Zusammenhänge und Regelmechanismen jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Ebenso gibt es auch keine allgemeingültige Regel über die zur Seneszenz führenden Signaltransduktionsmechanismen. Unsere Daten deuten darauf hin, dass in den untersuchten Zellen hauptsächlich der p53-p21-Weg aktiviert ist. Zumindest bei humanen Zellen ist dies häufig der initiale Mechanismus, der erst im weiteren Verlauf der Seneszenz über die pRb-p16-Achse zu einem stabilen und dauerhaften Seneszenzstatus führt. In Verbindung mit unseren Ergebnissen zum verlangsamten Zellzyklus ohne vollständig ausgebildeten Zellzyklusarrest legt dies die Vermutung nahe, dass wir es hier mit einer frühen Phase der Seneszenz zu tun haben, was, zumindest bei NHDF, auch auf den transienten und reversiblen Knockdown von Cathepsin X zurückzuführen sein kann.

E.4 Auswirkungen der Cathepsin X-Defizienz auf den IGF-I-Signalweg

Bei der Suche nach Signalwegen, die an der Ausbildung des seneszenten Phänotyps bei Cathepsin X-Defizienz beteiligt sind, erschien das *insulin-like growth factor* (IGF)-System schließlich als aussichtsreichster Kandidat. Dafür gab es zwei wesentliche Gründe: Zum einen ist dieses System essentiell an der Regulation von Prozessen wie Wachstum und Differenzierung beteiligt. Den zweiten Grund lieferte die Überlegung, dass der IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor neben der Internalisierung von IGF-II auch für den Transport M6P-haltiger Proteine von außerhalb zurück in die Zelle zuständig ist (Ludwig et al., 1995). Weiterhin besitzt Cathepsin X, wie prinzipiell alle lysosomalen Cathepsine, M6P-Reste, wodurch extrazellulär vorhandenes Enzym an den IGF-II/M6P-Rezeptor binden kann, um internalisiert und schließlich dem lysosomalen Weg zugeführt zu werden. Neben M6P ist IGF-II ein weiterer Ligand dieses Rezeptors. Dieser Wachstumsfaktor bindet aber nicht exklusiv an den IGF-II-Rezeptor, sondern

auch an den IGF-I-Rezeptor, wodurch Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt werden können. IGF-I dagegen kann ausschließlich an den IGF-I-Rezeptor, nicht aber an den IGF-II-Rezeptor, binden. Hinzu kommt, dass beide IGFs zusätzlich mit dem Insulinrezeptor interagieren können, ebenso wie umgekehrt Insulin in der Lage ist, an den IGF-I-Rezeptor zu binden (Abb. E.1).

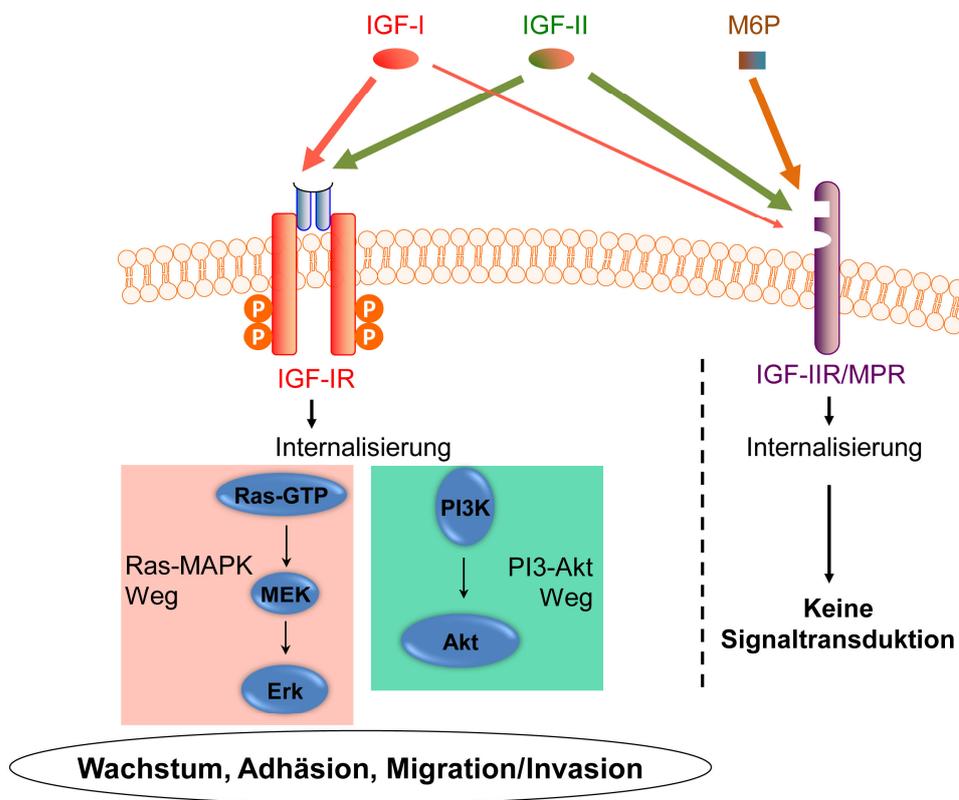


Abb. E.1: Übersicht über das IGF-System. Die Liganden IGF-I und IGF-II binden sowohl an den IGF-I-Rezeptor als auch an den IGF-II-Rezeptor. Nur eine Interaktion mit dem IGF-IR kann eine Signaltransduktion auslösen. Im Gegensatz dazu leitet der IGF-IIR/MPR (IGF-II-Rezeptor/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) keine Signale weiter, sondern führt die gebundenen Liganden dem Lysosom zu.

Nach bisherigem Wissen kann die Aktivierung einer Signalkaskade in diesem System nur über den IGF-I-Rezeptor erfolgen, und dies kann sowohl durch IGF-I oder aber IGF-II erreicht werden. Über den IGF-IIR werden nach aktuellem Kenntnisstand keine Signale vermittelt, sondern vielmehr kommt ihm, neben der erwähnten Internalisierung M6P-haltiger Proteine, eine regulatorische Funktion zu. Im Organismus ist die Konzentration von IGF-II etwa viermal so hoch wie die von IGF-I, was dafür spricht, dass IGF-II auch entscheidend an der Aktivierung des IGF-I-Rezeptors beteiligt ist. Durch Modulation der IGF-II-Rezeptormenge an der Zelloberfläche kann die Menge an verfügbarem IGF-II reguliert werden, so dass je nach Bedarf mehr oder weniger Moleküle des Liganden für die Bindung an den IGF-IR zur Verfügung stehen. Die Aktivierung des IGF-I-Rezeptors kann also indirekt über die Menge an freiem IGF-II-Rezeptor beeinflusst werden (Ellis et al., 1996). Nun ist es denkbar, dass hohe Mengen an extrazellulär

vorhandenem Cathepsin X oder auch einer anderen lysosomalen Protease einen großen Anteil der IGF-II-Rezeptor-Moleküle besetzen und somit gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert werden. Durch diesen Prozess stünde folglich eine verminderte Anzahl freier IGF-II-Rezeptoren zur Verfügung, weshalb IGF-II vermehrt an den IGF-I-Rezeptor binden und damit Signaltransduktion auslösen würde. Die Folge wäre eine verstärkte Proliferation und erhöhte Resistenz gegenüber zellulärer Seneszenz. Wie sich eine Defizienz des IGF-II/M6P-Rezeptors auswirkt, wurde kürzlich an fetalen Hepatozyten der Ratte gezeigt: Die Invasion und Motilität der Leberzellen wurde durch die Rezeptor-Defizienz stark herabgesetzt (Puxbaum et al., 2012).

Viele Tumorzellen sind durch eine stark erhöhte Sezernierung lysosomaler Proteasen gekennzeichnet. Diese sollen laut gängiger Meinung gemeinsam mit Proteasen anderer Klassen, wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Serinproteasen, EZM direkt oder über Aktivierung nachgeschalteter Proteasen abbauen, um so die Tumordinvasion zu ermöglichen. Doch wie unsere Ergebnisse zu Cathepsin X nun belegen, scheint ein weiterer Vorteil, der sich aus der Überexpression von Cathepsin X in Tumorzellen ergibt, in der Umgehung der zellulären Seneszenz zu liegen. Ob daran tatsächlich das IGF-Rezeptorsystem beteiligt ist, sollten weitere Experimente mit den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und LNCaP aufklären. Aufgrund der höheren IGF-Rezeptormenge und der daraus resultierenden leichteren Detektion derselben wurden die Tumorzellen für diese Zwecke den Fibroblasten vorgezogen.

Interessanterweise wurden bei beiden Cathepsin X-defizienten Prostatakarzinomzelllinien sowohl eine verstärkte Expression mRNA-Ebene als auch erhöhte Proteinmengen des IGF-I-Rezeptors nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde jedoch eine verminderte Rezeptor-phosphorylierung nach Stimulation mit IGF-I ermittelt. Auch die immunhistochemischen Färbungen zeigten in Cathepsin X-defizienten PC-3-Zellen reduzierte Mengen sowohl des phosphorylierten IGF-IR als auch der phosphorylierten *focal adhesion kinase* (FAK). Eine Erklärung hierfür könnte die oben genannte Hypothese liefern. Es ist bekannt, dass PC-3-Zellen zwar kein IGF-I, dafür aber IGF-II produzieren, welches ebenfalls einen wachstumsfördernden autokrinen Effekt hat (Angelloz-Nicoud and Binoux, 1995). Ein Knockdown des sonst in großen Mengen sezernierten Cathepsin X sollte demnach folgendes bewirken: es sind mehr freie IGF-II-Rezeptormoleküle verfügbar, die erhöhte Mengen IGF-II internalisieren, so dass diese nicht mehr für die Aktivierung des IGF-IR zur Verfügung stehen. Das Ergebnis sind eine geringere IGF-I-Rezeptoraktivierung und somit eine geringere Proliferation. Die Zunahme der Gesamtzeptormenge für IGF-I lässt sich möglicherweise durch Kompensationsmechanismen erklären, die in den Zellen ablaufen, um den Proliferationsnachteil auszugleichen. Demnach wäre die Zunahme der IGF-I-Rezeptormoleküle als Ausgleich für die verminderte verfügbare Ligandenmenge anzusehen. Weiterhin ist bekannt, dass FAK und IGF-IR miteinander interagieren können und dass Signale über diese beiden Komponenten weitergeleitet werden (Liu et al., 2008). Es spricht ebenfalls für eine reduzierte Bindung von IGF-Molekülen an den IGF-I-Rezeptor, dass auch diese Interaktion bei Cathepsin-X-Defizienz gehemmt ist.

Überraschenderweise ließen sich die mit IGF-I gewonnenen Ergebnisse bei einer Stimulation mit IGF-II in keiner der beiden Tumorzelllinien nachweisen. So sahen wir nach einer Stimulation mit IGF-II, im Gegensatz zur Stimulation mit IGF-I, keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung des IGF-I-Rezeptors. Die Menge an phospho-IGF-IR erscheint nach Cathepsin X-Knockdown zwar auf den ersten Blick erhöht, dies ist aber lediglich auf die höhere Gesamtmenge des Rezeptors zurückzuführen, da sich das Verhältnis zwischen phospho- und Gesamtrezeptor nach IGF-II-Stimulation nicht veränderte. Dieses Ergebnis ist nicht ohne weiteres zu erklären, und es bedarf weiterer Experimente, um die Ursache dafür zu finden.

Auch die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen bestätigen die Unterschiede zwischen der Stimulation mit IGF-I und IGF-II, da bei letzterem ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Cathepsin X-defizienten Zellen auftraten. Die große Komplexität dieses Systems verhindert es, aus diesen Experimenten eindeutige Rückschlüsse zu ziehen. Für weitergehende Untersuchungen ist es nötig, auch die 6 verschiedenen IGF-Bindeproteine (IGFBPs) mit in Betracht zu ziehen (Nguyen et al., 2013). Diese binden an IGF-I und IGF-II mit ähnlich hohen Affinitäten wie die entsprechenden Rezeptoren und regulieren so deren biologische Verfügbarkeit (Firth and Baxter, 2002). Dabei können IGFBPs einerseits die IGF-IR-Aktivierung über die Erhöhung der IGF-Halbwertszeiten fördern, andererseits können sie auch die Bindung der IGFs an den Rezeptor durch kompetitive Hemmung vermindern. IGFBPs werden ihrerseits beispielsweise durch Phosphorylierung oder proteolytische Prozessierung reguliert, wodurch ihre Bindungsaffinitäten und Bioverfügbarkeiten gesteigert oder auch erniedrigt werden. Zusätzliche Komplexität erreicht dieses System durch die Tatsache, dass die als Dimere vorkommenden Rezeptoren für IGF und Insulin auch untereinander hybridisieren können (Belfiore et al., 2009). Die Heterodimere aus Insulin- und IGF-I-Rezeptor besitzen wieder jeweils spezifische Eigenschaften und erschweren somit die Analyse dieses Systems zusätzlich (s. Abb. B.2).

Bezüglich des Proliferationsverhaltens reagierten die PC-3-Zellen ähnlich wie die Fibroblasten auf einen Cathepsin X-Mangel. Die Defizienz führte jeweils zu einem Proliferationsverlust, jedoch war die Reduktion im Proliferationsverhalten im Vergleich zu den untransformierten Zellen deutlich abgeschwächt. Überraschenderweise zeigten die PC-3-Zellen in den Proliferationsassays keine Reaktion auf eine Stimulation mit einem der beiden IGFs. Die Ursache dafür liegt wohl in der bemerkenswerten Tatsache begründet, dass die Tumorzellen trotz des Serumentzugs weiter auf hohem Niveau proliferieren können, so dass auch eine Zugabe von IGF-I oder -II keinen weiteren Wachstumsschub verursachen konnte. Das spricht dafür, dass in dieser Prostatakarzinomzelllinie die proliferativen Regelmechanismen stark dereguliert sind und die Zellen kaum noch auf externe Stimuli ansprechen. In Boyden-Kammer Experimenten wirkten sich die beiden IGFs dagegen positiv auf die Invasion der Karzinomzellen aus, woraus sich eine ausgeprägte Chemotaxis dieser Tumorzellen ableiten lässt. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Blasenkrebszellen publiziert, die ebenfalls nicht proliferativ auf IGFs reagierten, deren Invasion durch die Wachstumsfaktoren dagegen ebenfalls deutlich erhöht wurde (Metalli et al., 2010). Entgegen unserer Erwartungen konnten in der Boyden-Kammer

jedoch keine nennenswerten Unterschiede im Ansprechverhalten auf IGF-I oder IGF-II festgestellt werden. Das überrascht zunächst, da die Aktivierung des IGF-I-Rezeptors unter Cathepsin X-Defizienz deutlich vermindert ist, wie die vorangegangenen Untersuchungen zeigen. Offensichtlich wird dies, zumindest in Bezug auf die Chemotaxis durch die gleichzeitig erhöhte Menge des Gesamtrezeptors wieder ausgeglichen. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Phosphorylierung des IGF-I-Rezeptors den Ausgangspunkt hochkomplexer Signalkaskaden markiert, so dass eine Beeinträchtigung einer einzelnen Komponente durch parallele Wege relativ leicht kompensiert werden kann.

Wie wir zeigen konnten, führt eine Defizienz für Cathepsin X sowohl in humanen als auch murinen Fibroblasten zur beschleunigten Ausprägung eines seneszenten Phänotyps. Unsere bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass dies von einer verminderten Aktivierbarkeit des IGF-I-Rezeptors durch IGF-I ausgeht. Allerdings sind die Zusammenhänge hier noch nicht abschließend geklärt. Unsere weiteren Untersuchungen von *downstream* des IGF-I-Rezeptors gelegenen Signalkaskaden deuten darauf hin, dass Komponenten des MAPK-Signalwegs an der Regulation der Seneszenz in Cathepsin X-defizienten Zellen beteiligt sind. Von den drei in Säugern vorhandenen MAPK Kaskaden wurden bei zwei dieser Wege veränderte Aktivierungszustände nach einem Knockdown von Cathepsin X gefunden. So enthielten Cathepsin X-defiziente NHDF erniedrigte Mengen der phosphorylierten und damit aktivierten Form der ERK-Kinase, wohingegen die Phosphorylierung von JNK erhöht war. Der ERK-Weg wird hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren stimuliert und spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation. ERK1/2 kontrollieren die Zellproliferation über verschiedene Mechanismen, wie etwa durch die Induktion positiver Zellzyklusregulatoren (Meloche and Pouyssegur, 2007). Dies spricht dafür, dass die Reduktion der Proliferationsfähigkeit bei Cathepsin X-Defizienz auf die verminderte Aktivierung von ERK1/2 zurückzuführen ist. Unter anderem aktivieren ERK1/2 den pro-proliferativen Transkriptionsfaktor Elk-1 (Gille et al., 1995) oder stabilisieren c-Fos, wodurch sich aktive AP-1-Komplexe bilden, welche wiederum die Cyclin-D1-Expression begünstigen (Whitmarsh and Davis, 1996; Shaulian and Karin, 2001; Murphy et al., 2002). Über JNK ist bekannt, dass es in humanen Fibroblasten und weiteren Zelltypen als positiver Regulator von p53 wirkt (Buschmann et al., 2001), was unter anderem zur Induktion der zellulären Seneszenz führen kann.

Unter Cathepsin X-Defizienz konnte demnach für ERK und JNK eine differentielle Aktivierung festgestellt werden. Bei den weiteren untersuchten Komponenten dieser beiden Arme des MAPK-Signalwegs fanden sich dagegen keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Menge oder Aktivierung. Somit sind weitere Studien notwendig, um die betroffenen Signalwege genauer zu bestimmen und damit die Ursachen der erniedrigten ERK-Phosphorylierung sowie der erhöhten JNK-Phosphorylierung zu finden. Interessanterweise verhinderte eine Defizienz für ERK 1 oder 2 in primären Zellen, die onkogenes Ras exprimieren, die Ausbildung der zellulären Seneszenz (Deschenes-Simard et al., 2013). Dies belegt die Bedeutung des MAPK-Systems für die Seneszenz. Problematisch ist hierbei die Tatsache, dass diese Signalwege eine enorme Komplexität aufweisen und sich je nach Zelltyp und Spezies zum Teil deutlich unterscheiden. So

kann die JNK-Aktivität einerseits positiv auf die Induktion der Seneszenz wirken, wie oben beschrieben, andererseits kann auch ein Verlust oder eine Inhibition dieser Kinase ganz ähnliche Auswirkungen haben. Beispielsweise wurde ein verlangsamtes Wachstum in Verbindung mit einer erhöhten SA- β -Gal-Aktivität bei MEF aus Mäusen gefunden, die eine Defizienz für JNK1 und JNK2 aufwiesen (Das et al., 2007). Auch in Myelomzellen (Hideshima et al., 2003) und in Brustkrebszellen (Mingo-Sion et al., 2004) bewirkte eine Inhibition von JNK eine reduzierte Zellproliferation. Es lassen sich somit keine allgemein gültigen Aussagen darüber treffen, welche zellulären Reaktionen durch Aktivierung oder Inhibition bestimmter Signalwege oder einzelner Komponenten davon ausgelöst werden.

Unsere Studien an Prostatakarzinomzellen zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen Cathepsin X-Defizienz und einer verminderten Phosphorylierung des IGF-I-Rezeptors sowie der nachgeschalteten *focal adhesion kinase* (FAK). Es ist zudem sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Veränderungen in den Aktivierungszuständen von ERK und JNK auf die verminderte Aktivierung des IGF-IR durch IGF-I zurückzuführen sind. In PC-3-Zellen scheinen diese Effekte jedoch durch eine umfassende Deregulation zahlreicher Kontrollmechanismen größtenteils kompensiert zu werden, so dass in funktionalen Assays kaum Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität auf eine IGF-I-Stimulation feststellbar sind. Um den zugrundeliegenden Mechanismus weiter zu entschlüsseln, sind weiterführende Studien nötig, die nicht nur Tumorzellen, sondern auch untransformierte Zellen einschließen. Mit NHDF konnten diese Versuche nicht durchgeführt werden, da bei diesen Zellen die Menge an (phosphoryliertem) IGF-IR zu gering war, um eine Aktivierung mit Immunbiochemischen Methoden nachweisen zu können. Die vollständige Aufklärung der Vorgänge am und *downstream* des IGF-I-Rezeptors in Cathepsin X-defizienten Zellen bleibt das Ziel zukünftiger Studien.

E.5 Auswirkungen der Cathepsin X-Defizienz auf die Autophagie

Autophagie ist ein konservierter Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase unverzichtbar ist. Durch diesen Prozess werden cytoplasmatische Bestandteile und Zellorganellen kontinuierlich recycelt, um der Zelle neue Nährstoffe und Energie zur Verfügung zu stellen. In den letzten Jahren häuften sich außerdem Berichte über eine Verbindung zwischen Autophagie- und Seneszenzmechanismen. So wurde gezeigt, dass Autophagie die durch onkogenen Stress induzierte Seneszenz vermittelt und dass eine Inhibition der Autophagie zu einer Verzögerung der Seneszenz führt (White and Lowe, 2009; Young et al., 2009). Außerdem wird durch oxidativen Stress Autophagie induziert, welche im weiteren Verlauf die zelluläre Seneszenz über p21, ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, reguliert (Luo et al., 2011). Auch eine Studie an biliären Epithelzellen weist auf eine Beziehung zwischen Autophagie und zellulärer Seneszenz hin. Danach können Störungen im Prozess der Autophagie zu einer Induktion der zellulären Seneszenz beitragen (Sasaki et al., 2012).

In Cathepsin X-defizienten NHDF konnten wir geringe, jedoch reproduzierbare Unterschiede im Verhalten der Zellen bei autophagischen Prozessen im Vergleich zu den Kontrollen feststellen. Mit Hilfe einer fluoreszenten Form des *microtubule-associated protein 1 light chain 3 isoform b* (LC3B), welches sich in die Membranen von Autophagosomen einlagert, konnte der Autophagieprozess optisch dargestellt werden. Während für LC3B-positive Vesikel nur sehr geringe Veränderungen hinsichtlich deren Größe auftraten, war das lysosomale Volumen, bestimmt durch LysoTracker-Färbungen, signifikant erhöht. Ein weiterer Hinweis für eine Zunahme der Lysosomenmenge ist das vermehrte Vorkommen des lysosomalen Markers Lamp1. Ähnliche Daten, zumindest in Bezug auf das lysosomale Volumen, wurden auch nach einem Knockout von Cathepsin L in MEF erhalten (Dennemarker et al., 2010). Die Autoren der letztgenannten Studie vermuten, dass durch eine Cathepsin L-Defizienz zwar nicht die Initiation der Autophagie beeinträchtigt ist, dass jedoch ein unzureichender Abbau der Autophagolysosomen die beobachteten Ergebnisse erklären kann. Ähnliches könnte auch bei einer Cathepsin X-Defizienz der Fall sein. Dafür sprechen auch die erhöhten Werte des Lysosomenmarkers Lamp1, während wir für das *early endosomal antigen 1* (EEA1), welches mit frühen Phasen des Autophagie-Prozesses assoziiert ist, keine Veränderungen feststellten.

Im Unterschied zu unseren Untersuchungen an Cathepsin X-defizienten NHDF wiesen Cathepsin L^{-/-}-MEF allerdings deutlich erhöhte Mengen GFP-LC3-positiver Vesikel auf (Dennemarker et al., 2010). Ob diese Unterschiede Spezies-spezifisch sind oder ob die unterschiedlichen Cathepsine diese Differenzen bewirken, müssen weitere Studien klären. Da wir das endosomale Protein EEA1 in ähnlichen Mengen in Cathepsin X-defizienten NHDF wie in den Kontrollzellen gefunden haben und lediglich die Größe der GFP-LC3B-positiven Vesikel minimal abgenommen hat, kann man in diesem Fall von lediglich leichten Störungen der Autophagiewege ausgehen. Die mit LysoTracker beobachtete Vergrößerung der sauren Vesikel ist dabei am wahrscheinlichsten auf den ausgeprägten seneszenten Phänotyp bei Cathepsin X-Defizienz zurückzuführen, der mit

einer erhöhten Lysosomenzahl einhergeht. Im Gegensatz zu einer Cathepsin L-Defizienz konnten wir keine Anzeichen für einen gestörten autophagischen Abbau der Lysosomen finden.

Neben Cathepsin L-Defizienzen stehen auch reduzierte Level für Cathepsin B und für die lysosomale Aspartat-Protease Cathepsin D mit einem gestörten autophagischen Abbau im Zusammenhang: Saposin C-Defizienz (Sap C) ist eine seltene Form des Morbus Gaucher, einer lysosomalen Speicherkrankheit. In humanen Fibroblasten verhindert die Sap C-Defizienz den korrekten Abbau der Autophagosomen. Als Ursache dafür benannten die Autoren der Studie verringerte Werte für Cathepsin B und Cathepsin D, da eine Überexpression dieser beiden Proteasen die Autophagie-Defekte größtenteils aufheben konnte (Tatti et al., 2012). Desweiteren führten verschiedene reversible und irreversible Inhibitoren der Cathepsine B und L in Neuroblastom-Zelllinien ebenfalls zu einer Akkumulierung von Autophagie-Markern (Cartledge et al., 2013). Der dahinterstehende Mechanismus konnte jedoch bisher noch nicht geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cathepsin X-Defizienz neben der beschleunigten Seneszenz auch Veränderungen des autophagosomalen Systems hervorruft, deren Ausmaß jedoch gering ist. Diese beiden Vorgänge sind zudem über hochkomplexe Mechanismen miteinander verbunden, die bisher nur ansatzweise verstanden sind. Darüber hinaus lassen sich die beobachteten Veränderungen, insbesondere die Zunahme des lysosomalen Volumens, nicht ausschließlich der Autophagie zuordnen, sondern können auch direkte Auswirkungen der Seneszenz darstellen.

F Schlussfolgerungen und Ausblick

Cathepsin X wird in verschiedenen Tumortypen, wie dem Prostatakarzinom oder dem Magenkarzinom, stark heraufreguliert (Nägler et al., 2004; Krueger et al., 2005). Die Funktion dieser Protease in den Tumorzellen war bisher unklar. Während andere Proteasen, wie beispielsweise Cathepsin L oder Matrix-Metalloproteasen (MMPs), am Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt sind und somit zur Invasion der Krebszellen beitragen können, besteht diese Möglichkeit für Cathepsin X aufgrund dessen strikter Carboxypeptidaseaktivität nicht. Unsere Transwell-Experimente mit Cathepsin X-defizienten Zellen, bei denen ein vermindertes Invasionsvermögen nachgewiesen wurde, scheinen dieser Hypothese zunächst entgegenzustehen. Auch *in-vivo* Daten belegen einen Zusammenhang zwischen Cathepsin X und der Pathogenese bei Tumorerkrankungen: Im *polyoma middle T* (PymT)-Mausmodell zeigten Cathepsin X/B-doppelt-defiziente Mäuse eine reduzierte Brustkrebsprogression sowie -metastasierung (Sevenich et al., 2010). Bemerkenswert ist hierbei, dass signifikante Effekte nur bei den doppelt-defizienten Mäusen zu beobachten waren, jedoch nicht bei den Einzel-*Knockouts*, was für eine zumindest teilweise reziproke Kompensation der Cathepsine B und X spricht. In einer klinischen Studie korrelierten zudem höhere Cathepsin X-Werte im Serum von an kolorektalem Karzinom leidenden Patienten mit einer verschlechterten Prognose und verkürzter Überlebenszeit (Vizin et al., 2012). Dass die Ursache für derartige Befunde erwartungsgemäß nicht im Abbau von EZM-Komponenten durch Cathepsin X zu suchen ist, belegen unsere Experimente mit fluorogenen EZM-Substraten. Dabei fand kein nennenswerter Abbau der Substrate durch Cathepsin X statt. Auch eine Studie, in der ein Cathepsin X-inaktivierender Antikörper in Transwell-Experimenten mit einer Brustkrebszelllinie eingesetzt wurde, deutet in dieselbe Richtung. In diesen Versuchen wurde lediglich das aktive Zentrum durch den Antikörper blockiert, während die Expression unverändert blieb. Die Cathepsin X-Inaktivierung durch den Antikörper hatte in diesen Versuchen keinen Einfluss auf die Transmigration (Kos et al., 2005). Anders verhielt es sich mit dem auch endoproteolytisch wirkenden Cathepsin B, dessen Inaktivierung zu einem Rückgang der Invasionsfähigkeit der Brustkrebszellen führte.

Umgekehrt kann davon ausgegangen werden, dass Cathepsin X unterstützend auf die Tumorphathogenese wirkt. Die proteolytische Aktivität dieser Protease steht mit diesen Prozessen, vor allem der Invasion, allerdings nicht in direktem Zusammenhang. Bisher gab es keine zufriedenstellende Erklärung für die Cathepsin X-abhängige Invasion von Tumorzellen *in vitro*. Die vorliegende Arbeit bietet nun erstmals eine Erklärung für dieses Phänomen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Ursache dafür die seneszenzbedingte Zunahme des Zelldurchmessers ist, wodurch die Fähigkeit der Cathepsin-X-defizienten Zellen, über die Transwell-Membran mit ihrer definierten Porengröße zu wandern, im Vergleich zu den kleineren Kontrollzellen eingeschränkt wird. Hinzu kommt, dass seneszente Zellen im Vergleich zu nicht-seneszenten Zellen generell als weniger migrationsfreudig gelten (Nishio and Inoue, 2005). Unter diesem Gesichtspunkt kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine erhöhte

Cathepsin X-Expression in Tumoren es diesen ermöglicht, die zelluläre Seneszenz zu umgehen und hohe Proliferationsraten der Tumorzellen aufrechtzuerhalten.

Der Mechanismus, über den Cathepsin X die Ausbildung der Seneszenz beeinflusst, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ansatzweise geklärt werden. Primäre NHDF und MEF reagieren auf die Cathepsin X-Defizienz mit der Entwicklung eines seneszenten Phänotyps, der durch einen vergrößerten Zelldurchmesser, erhöhte Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-Aktivität und einen verlangsamten Zellzyklus mit einem partiellen Zellzyklusarrest in G_1 gekennzeichnet ist. Dabei wurden die Seneszenz-assoziierten Proteine p16, p21, p53 und Caveolin-1 heraufreguliert. In Prostatakarzinomzellen konnten wir zeigen, dass die Cathepsin X-Defizienz zu Störungen der IGF-I-Signalweiterleitung über den IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) führt. Dies hat Folgen für das *downstream* gelegene *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Netzwerk, bei dem eine reduzierte ERK-Phosphorylierung bei gleichzeitig erhöhter JNK-Phosphorylierung nachgewiesen wurde. Dies führt schließlich zu einer verlangsamten Proliferation und der Ausbildung eines seneszenten Phänotyps. Unklar bleibt jedoch, wie die verminderte IGF-IR-Aktivierung die MAP-Kinasen beeinflusst. Um diesen Mechanismus vollständig aufzuklären, sind weitere Experimente in einem geeigneten Zellsystem nötig.

Unsere Ergebnisse belegen erstmals einen Zusammenhang zwischen der Defizienz für eine Protease und dem Auftreten von Seneszenz-assoziierten morphologischen und funktionellen Veränderungen. In der Entwicklung therapeutischer Ansätze erfährt das Konzept der zellulären Seneszenz immer mehr Beachtung und kann sich zu einer Alternative für schlecht auf Apoptose ansprechende Tumorzellen entwickeln. Es hat sich gezeigt, dass bereits bei den bestehenden Chemo- und Strahlungstherapien die Suppression der Tumorprogression nicht ausschließlich auf Apoptose beruht, sondern dass sich hierbei im Tumor auch seneszente Zellen bilden. Dabei hatten Mäuse mit Seneszenz-fähigen Tumoren deutlich bessere Prognosen als Mäuse mit Tumoren, die einen Seneszenz-defekt aufwiesen (Chang et al., 1999a; Chang et al., 1999b). Dies belegt die Relevanz der Seneszenz in der Bekämpfung von Tumoren und zeigt, dass das Seneszenzprogramm auch *in-vivo* in Tumorzellen induziert werden kann. Daher könnten Medikamente, die gezielt die zelluläre Seneszenz induzieren, einen innovativen und vielversprechenden Ansatz für die Tumorthherapie darstellen.

Um entsprechende effektive Medikamente zu entwickeln, ist es daher nötig, die Vorgänge innerhalb der Zelle, die zur Seneszenz führen, besser zu verstehen und vollständig zu entschlüsseln. Da Tumoren einem Selektionsdruck ausgesetzt sind, Seneszenzmechanismen zu umgehen oder stillzulegen, müssen zudem Wege gefunden werden, um diese Seneszenzblockaden wieder aufzuheben. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Cathepsin X und möglicherweise auch andere Cathepsine einen relevanten Bestandteil der Schutzbarrieren der Tumorzellen vor Seneszenz darstellen. Dieses Wissen kann möglicherweise eines Tages dazu eingesetzt werden, effektive auf Seneszenz basierende Tumorthapien zu entwickeln.

G Literaturverzeichnis

- Angelloz-Nicoud, P., and Binoux, M. (1995). Autocrine regulation of cell proliferation by the insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein-3 protease system in a human prostate carcinoma cell line (PC-3). *Endocrinology* 136, 5485-5492.
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 66, 3034-3043.
- Bäck, K., Brannmark, C., Stralfors, P., and Arnqvist, H.J. (2011). Differential effects of IGF-I, IGF-II and insulin in human preadipocytes and adipocytes--role of insulin and IGF-I receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 339, 130-135.
- Bains, M., Florez-McClure, M.L., and Heidenreich, K.A. (2009). Insulin-like growth factor-I prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation. *J. Biol. Chem.* 284, 20398-20407.
- Bains, M., Zaegel, V., Mize-Berge, J., and Heidenreich, K.A. (2011). IGF-I stimulates Rab7-RILP interaction during neuronal autophagy. *Neurosci. Lett.* 488, 112-117.
- Baron, V., Calleja, V., Ferrari, P., Alengrin, F., and Van Obberghen, E. (1998). p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors. *The Journal of biological chemistry* 273, 7162-7168.
- Bartholomew, J.N., Volonte, D., and Galbiati, F. (2009). Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Res.* 69, 2878-2886.
- Basbaum, C.B., and Werb, Z. (1996). Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 731-738.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal* 22, 4212-4222.
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P.W., Mayer, R.J., and Roelofs, J. (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol.* 20, 391-401.
- Beitner-Johnson, D., and LeRoith, D. (1995). Insulin-like growth factor-I stimulates tyrosine phosphorylation of endogenous c-Crk. *The Journal of biological chemistry* 270, 5187-5190.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* 30, 586-623.

- Berdowska, I. (2004). Cysteine proteases as disease markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 342, 41-69.
- Bertenshaw, G.P., Norcum, M.T., and Bond, J.S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *J. Biol. Chem.* 278, 2522-2532.
- Binossek, M.L., Nägler, D.K., Becker-Pauly, C., and Schilling, O. (2011). Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *J. Proteome Res.* 10, 5363-5373.
- Bode, W., and Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 241-252.
- Bromme, D., Li, Z., Barnes, M., and Mehler, E. (1999). Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 2377-2385.
- Bromme, D., Okamoto, K., Wang, B.B., and Biroc, S. (1996). Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *The Journal of biological chemistry* 271, 2126-2132.
- Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V.N., Fuchs, S.Y., Henderson, S., Fried, V.A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M.R., *et al.* (2001). Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2743-2754.
- Butler, A.A., Yakar, S., Gewolb, I.H., Karas, M., Okubo, Y., and LeRoith, D. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 121, 19-26.
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11, S27-31.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-522.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729-740.
- Cartledge, D.M., Colella, R., Glazewski, L., Lu, G., and Mason, R.W. (2013). Inhibitors of cathepsins B and L induce autophagy and cell death in neuroblastoma cells. *Invest. New Drugs* 31, 20-29.
- Chakravarthy, M.V., Abraha, T.W., Schwartz, R.J., Fiorotto, M.L., and Booth, F.W. (2000). Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 275, 35942-35952.

- Chang, B.D., Broude, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I.B. (1999a). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* *59*, 3761-3767.
- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I.B. (1999b). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* *18*, 4808-4818.
- Clemmons, D.R. (2006). Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.* *6*, 620-625.
- Cristofalo, V.J., and Kabakjian, J. (1975). Lysosomal enzymes and aging in vitro: subcellular enzyme distribution and effect of hydrocortisone on cell life-span. *Mech. Ageing Dev.* *4*, 19-28.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194-198.
- Dai, C.Y., and Enders, G.H. (2000). p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* *19*, 1613-1622.
- Danielsen, A., Larsen, E., and Gammeltoft, S. (1990). Chromaffin cells express two types of insulin-like growth factor receptors. *Brain Res.* *518*, 95-100.
- Das, M., Jiang, F., Sluss, H.K., Zhang, C., Shokat, K.M., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2007). Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15759-15764.
- Deaton, D.N., and Kumar, S. (2004). Cathepsin K inhibitors: their potential as anti-osteoporosis agents. *Prog. Med. Chem.* *42*, 245-375.
- Demidenko, Z.N., and Blagosklonny, M.V. (2008). Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* *7*.
- Denault, J.B., Eckelman, B.P., Shin, H., Pop, C., and Salvesen, G.S. (2007). Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-mediated inhibition of caspase 9. *The Biochemical journal* *405*, 11-19.
- Denault, J.B., and Salvesen, G.S. (2003). Expression, purification, and characterization of caspases. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 21*, Unit 21 13.
- Dennemarker, J., Lohmuller, T., Muller, S., Aguilar, S.V., Tobin, D.J., Peters, C., and Reinheckel, T. (2010). Impaired turnover of autophagolysosomes in cathepsin L deficiency. *Biol. Chem.* *391*, 913-922.
- Deschenes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F.A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., *et al.* (2013). Tumor

- suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev.*
- Devanathan, G., Turnbull, J.L., Ziomek, E., Purisima, E.O., Menard, R., and Sulea, T. (2005). Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 445-452.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540-2551.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499-3511.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363-9367.
- Dirac, A.M., and Bernards, R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *The Journal of biological chemistry* 278, 11731-11734.
- Donnelly, S., Dalton, J.P., and Robinson, M.W. (2011). How pathogen-derived cysteine proteases modulate host immune responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 712, 192-207.
- Dupont, J., Karas, M., and LeRoith, D. (2000). The potentiation of estrogen on insulin-like growth factor I action in MCF-7 human breast cancer cells includes cell cycle components. *The Journal of biological chemistry* 275, 35893-35901.
- Dupont, J., Pierre, A., Froment, P., and Moreau, C. (2003). The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 35, 740-750.
- Edwards, D.R., and Murphy, G. (1998). Cancer. Proteases--invasion and more. *Nature* 394, 527-528.
- Eeckhout, Y., and Vaes, G. (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *The Biochemical journal* 166, 21-31.
- Ellis, M.J., Leav, B.A., Yang, Z., Rasmussen, A., Pearce, A., Zweibel, J.A., Lippman, M.E., and Cullen, K.J. (1996). Affinity for the insulin-like growth factor-II (IGF-II) receptor inhibits autocrine IGF-II activity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 10, 286-297.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.

- Firth, S.M., and Baxter, R.C. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 23, 824-854.
- Forbes, B.E., Hartfield, P.J., McNeil, K.A., Surinya, K.H., Milner, S.J., Cosgrove, L.J., and Wallace, J.C. (2002). Characteristics of binding of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II analogues to the type 1 IGF receptor determined by BIAcore analysis. *European journal of biochemistry / FEBS* 269, 961-968.
- Furlanetto, R.W., Harwell, S.E., and Frick, K.K. (1994). Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol. Endocrinol.* 8, 510-517.
- Galbiati, F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P.G., Zhu, L., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12, 2229-2244.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., and Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* 152, 165-180.
- Gay, N.J., and Walker, J.E. (1985). Molecular cloning of a bovine cathepsin. *The Biochemical journal* 225, 707-712.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., and Desnick, R.J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273, 1236-1238.
- Gerland, L.M., Peyrol, S., Lallemand, C., Branche, R., Magaud, J.P., and Ffrench, M. (2003). Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp. Gerontol.* 38, 887-895.
- Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 667-677.
- Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., and Shaw, P.E. (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO journal* 14, 951-962.
- Giorgetti, S., Ballotti, R., Kowalski-Chauvel, A., Tartare, S., and Van Obberghen, E. (1993). The insulin and insulin-like growth factor-I receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. *The Journal of biological chemistry* 268, 7358-7364.
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J.A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* 20, 543-556.
- Goretzki, L., Schmitt, M., Mann, K., Calvete, J., Chucholowski, N., Kramer, M., Gunzler, W.A., Janicke, F., and Graeff, H. (1992). Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett.* 297, 112-118.

- Grey, A., Chen, Q., Xu, X., Callon, K., and Cornish, J. (2003). Parallel phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways subserve the mitogenic and antiapoptotic actions of insulin-like growth factor I in osteoblastic cells. *Endocrinology* *144*, 4886-4893.
- Gual, P., Baron, V., Lequoy, V., and Van Obberghen, E. (1998). Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology* *139*, 884-893.
- Guo, M., Mathieu, P.A., Linebaugh, B., Sloane, B.F., and Reiners, J.J., Jr. (2002). Phorbol ester activation of a proteolytic cascade capable of activating latent transforming growth factor-beta1 a process initiated by the exocytosis of cathepsin B. *The Journal of biological chemistry* *277*, 14829-14837.
- Hagemann, S., Gunther, T., Dennemarker, J., Lohmuller, T., Bromme, D., Schule, R., Peters, C., and Reinheckel, T. (2004). The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles. *Eur. J. Cell Biol.* *83*, 775-780.
- Haldar, K., Kamoun, S., Hiller, N.L., Bhattacharje, S., and van Ooij, C. (2006). Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 922-931.
- Hamelers, I.H., van Schaik, R.F., Sipkema, J., Sussenbach, J.S., and Steenbergh, P.H. (2002). Insulin-like growth factor I triggers nuclear accumulation of cyclin D1 in MCF-7S breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* *277*, 47645-47652.
- Hart, T.C., Hart, P.S., Michalec, M.D., Zhang, Y., Firatli, E., Van Dyke, T.E., Stabholz, A., Zlotogorski, A., Shapira, L., and Soskolne, W.A. (2000). Haim-Munk syndrome and Papillon-Lefevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *J. Med. Genet.* *37*, 88-94.
- Harvey, M., Sands, A.T., Weiss, R.S., Hegi, M.E., Wiseman, R.W., Pantazis, P., Giovanella, B.C., Tainsky, M.A., Bradley, A., and Donehower, L.A. (1993). In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* *8*, 2457-2467.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* *37*, 614-636.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585-621.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* *14*, 501-513.
- Hermanto, U., Zong, C.S., and Wang, L.H. (2000). Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase selectively inhibits cell proliferation in human breast cancer cells displaying enhanced insulin-like growth factor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* *11*, 655-664.

- Hideshima, T., Hayashi, T., Chauhan, D., Akiyama, M., Richardson, P., and Anderson, K. (2003). Biologic sequelae of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) activation in multiple myeloma cell lines. *Oncogene* 22, 8797-8801.
- Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T., and Mort, J.S. (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J. Biol. Chem.* 272, 1197-1202.
- Inaoka, T., Bilbe, G., Ishibashi, O., Tezuka, K., Kumegawa, M., and Kokubo, T. (1995). Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 89-96.
- Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.L., Beausejour, C., Jacobs, J.J., Van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 389-401.
- Jackson, J.G., and Pereira-Smith, O.M. (2006). p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res.* 66, 8356-8360.
- Jedeszko, C., and Sloane, B.F. (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.* 385, 1017-1027.
- Jia, L., Li, H., and Sun, Y. (2011). Induction of p21-dependent senescence by an NAE inhibitor, MLN4924, as a mechanism of growth suppression. *Neoplasia* 13, 561-569.
- Jones, J.I., and Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16, 3-34.
- Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Louwagie, M., Luche, S., and Garin, J. (2000). Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins. *Electrophoresis* 21, 3411-3419.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.
- Katakura, Y., Nakata, E., Miura, T., and Shirahata, S. (1999). Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 110-115.
- Kim, S.Y., Ryu, S.J., Kang, H.T., Choi, H.R., and Park, S.C. (2011). Defective nuclear translocation of stress-activated signaling in senescent diploid human fibroblasts: a possible explanation for aging-associated apoptosis resistance. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 16, 795-807.
- Kos, J., Sekirnik, A., Premzl, A., Zavasnik Bergant, V., Langerholc, T., Turk, B., Werle, B., Golouh, R., Repnik, U., Jeras, M., *et al.* (2005). Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp. Cell Res.* 306, 103-113.

- Koval, A.P., Karas, M., Zick, Y., and LeRoith, D. (1998). Interplay of the proto-oncogene proteins CrkL and CrkII in insulin-like growth factor-I receptor-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 273, 14780-14787.
- Krueger, S., Haeckel, C., Buehling, F., and Roessner, A. (1999). Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res.* 59, 6010-6014.
- Krueger, S., Kalinski, T., Hundertmark, T., Wex, T., Kuster, D., Peitz, U., Ebert, M., Nägler, D.K., Kellner, U., Malfertheiner, P., *et al.* (2005). Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J. Pathol.* 207, 32-42.
- Krueger, S., Kellner, U., Buehling, F., and Roessner, A. (2001). Cathepsin L antisense oligonucleotides in a human osteosarcoma cell line: effects on the invasive phenotype. *Cancer Gene Ther.* 8, 522-528.
- Krupa, J.C., Hasnain, S., Nägler, D.K., Menard, R., and Mort, J.S. (2002). S2' substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem. J.* 361, 613-619.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 20), 3613-3622.
- Lah, T.T., Cercek, M., Blejec, A., Kos, J., Gorodetsky, E., Somers, R., and Daskal, I. (2000). Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 578-584.
- Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R., and Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *The Journal of biological chemistry* 271, 20608-20616.
- Lavrik, I.N., and Krammer, P.H. (2012). Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 19, 36-41.
- Lechner, A.M., Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochum, M., and Nägler, D.K. (2006). RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin alphavbeta3 mediates cell-adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 281, 39588-39597.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187-195.
- Levicar, N., Dewey, R.A., Daley, E., Bates, T.E., Davies, D., Kos, J., Pilkington, G.J., and Lah, T.T. (2003). Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human brain tumor cell invasion in vitro and promotes apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 10, 141-151.

- Lin, J.J., Milhollen, M.A., Smith, P.G., Narayanan, U., and Dutta, A. (2010). NEDD8-targeting drug MLN4924 elicits DNA rereplication by stabilizing Cdt1 in S phase, triggering checkpoint activation, apoptosis, and senescence in cancer cells. *Cancer Res.* *70*, 10310-10320.
- Liu, W., Bloom, D.A., Cance, W.G., Kurenova, E.V., Golubovskaya, V.M., and Hochwald, S.N. (2008). FAK and IGF-IR interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* *29*, 1096-1107.
- Los, M., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* *10*, 629-639.
- Ludwig, T., Le Borgne, R., and Hoflack, B. (1995). Roles for mannose-6-phosphate receptors in lysosomal enzyme sorting, IGF-II binding and clathrin-coat assembly. *Trends Cell Biol.* *5*, 202-206.
- Luo, Y., Zou, P., Zou, J., Wang, J., Zhou, D., and Liu, L. (2011). Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPKalpha dependent manner. *Exp. Gerontol.*
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* *146*, 3-15.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., and Sajid, M. (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* *1*, 497-536.
- Mehta, I.S., Figgitt, M., Clements, C.S., Kill, I.R., and Bridger, J.M. (2007). Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1100*, 250-263.
- Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* *26*, 3227-3239.
- Metalli, D., Lovat, F., Tripodi, F., Genua, M., Xu, S.Q., Spinelli, M., Alberghina, L., Vanoni, M., Baffa, R., Gomella, L.G., *et al.* (2010). The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin. *Am. J. Pathol.* *176*, 2997-3006.
- Mingo-Sion, A.M., Marietta, P.M., Koller, E., Wolf, D.M., and Van Den Berg, C.L. (2004). Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* *23*, 596-604.
- Mitsui, Y., and Schneider, E.L. (1976). Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Exp. Cell Res.* *100*, 147-152.
- Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 764-775.
- Mondello, C., and Scovassi, A.I. (2010). Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. *Subcell. Biochem.* *50*, 307-323.

- Morcavallo, A., Gaspari, M., Pandini, G., Palumbo, A., Cuda, G., Larsen, M.R., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2011). Research resource: New and diverse substrates for the insulin receptor isoform A revealed by quantitative proteomics after stimulation with IGF-II or insulin. *Mol. Endocrinol.* *25*, 1456-1468.
- Mortier, A., Gouwy, M., Van Damme, J., and Proost, P. (2011). Effect of posttranslational processing on the in vitro and in vivo activity of chemokines. *Exp. Cell Res.* *317*, 642-654.
- Mortier, A., Van Damme, J., and Proost, P. (2012). Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol. Lett.* *145*, 2-9.
- Moschos, S.J., and Mantzoros, C.S. (2002). The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* *63*, 317-332.
- Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tschlis, P.N., and Rosen, N. (1998). Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* *273*, 29864-29872.
- Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.H., Fingar, D.C., and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* *4*, 556-564.
- Nägler, D.K., Kruger, S., Kellner, A., Ziomek, E., Menard, R., Buhtz, P., Krams, M., Roessner, A., and Kellner, U. (2004). Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* *60*, 109-119.
- Nägler, D.K., Lechner, A.M., Oettl, A., Kozaczynska, K., Scheuber, H.P., Gippner-Steppert, C., Bogner, V., Biberthaler, P., and Jochum, M. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J. Immunol. Methods* *308*, 241-250.
- Nägler, D.K., and Menard, R. (1998). Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett.* *434*, 135-139.
- Nägler, D.K., and Menard, R. (2003). Family C1 cysteine proteases: biological diversity or redundancy? *Biol. Chem.* *384*, 837-843.
- Nägler, D.K., Storer, A.C., Portaro, F.C., Carmona, E., Juliano, L., and Menard, R. (1997). Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 12608-12615.
- Nägler, D.K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E.O., and Menard, R. (1999). Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 12648-12654.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A.Y. (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* *280*, 450-453.

- Nakagawa, T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J.D., Eastman, S.E., Howard, E.D., Clarke, S.R., *et al.* (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10, 207-217.
- Nalla, A.K., Gorantla, B., Gondi, C.S., Lakka, S.S., and Rao, J.S. (2010). Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 17, 599-613.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Nascimento, F.D., Rizzi, C.C., Nantes, I.L., Stefe, I., Turk, B., Carmona, A.K., Nader, H.B., Juliano, L., and Tersariol, I.L. (2005). Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.* 436, 323-332.
- Nguyen, D.V., Li Calzi, S., Shaw, L.C., Kielczewski, J.L., Korah, H.E., and Grant, M.B. (2013). An ocular view of the IGF-IGFBP system. *Growth Horm. IGF Res.*
- Nishimura, Y., Kawabata, T., Furuno, K., and Kato, K. (1989). Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 400-406.
- Nishio, K., and Inoue, A. (2005). Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochem. Cell Biol.* 123, 263-273.
- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.C., Xu, P.Z., Chen, M.L., Tonic, I., Unterman, T., and Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458-470.
- Obermajer, N., Premzl, A., Zavasnik Bergant, T., Turk, B., and Kos, J. (2006). Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2515-2527.
- Olsen, C.L., Gardie, B., Yaswen, P., and Stampfer, M.R. (2002). Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene* 21, 6328-6339.
- Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2, 657-672.
- Pantoja, C., and Serrano, M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18, 4974-4982.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5, 741-747.

- Petley, T., Graff, K., Jiang, W., Yang, H., and Florini, J. (1999). Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 31, 70-76.
- Pham, C.T., and Ley, T.J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8627-8632.
- Puente, X.S., and Lopez-Otin, C. (2004). A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res.* 14, 609-622.
- Puxbaum, V., Nimmerfall, E., Bauerl, C., Taub, N., Blaas, P.M., Wieser, J., Mikula, M., Mikulits, W., Ng, K.M., Yeoh, G.C., *et al.* (2012). M6P/IGF2R modulates the invasiveness of liver cells via its capacity to bind mannose 6-phosphate residues. *J. Hepatol.* 57, 337-343.
- Rawlings, N.D. (2013). Identification and prioritization of novel uncharacterized peptidases for biochemical characterization. *Database (Oxford)* 2013, bat022.
- Robbins, E., Levine, E.M., and Eagle, H. (1970a). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *The Journal of experimental medicine* 131, 1211-1222.
- Robbins, E., Levine, E.M., and Eagle, H. (1970b). Morphologic changes accompanying senescence of cultured human diploid cells. *J. Exp. Med.* 131, 1211-1222.
- Rodier, F., Kim, S.H., Nijjar, T., Yaswen, P., and Campisi, J. (2005). Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 977-990.
- Rosenthal, S.M., and Cheng, Z.Q. (1995). Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10307-10311.
- Rousselet, N., Mills, L., Jean, D., Tellez, C., Bar-Eli, M., and Frade, R. (2004). Inhibition of tumorigenicity and metastasis of human melanoma cells by anti-cathepsin L single chain variable fragment. *Cancer Res.* 64, 146-151.
- Rubin, R., and Baserga, R. (1995). Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 73, 311-331.
- Ryu, S.J., Oh, Y.S., and Park, S.C. (2007). Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ.* 14, 1020-1028.
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., and von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13453-13458.
- Sage, J., Miller, A.L., Perez-Mancera, P.A., Wysocki, J.M., and Jacks, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424, 223-228.

- Samani, A.A., and Brodt, P. (2001). The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10, 289-312, viii.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santamaria, I., Velasco, G., Pendas, A.M., Fueyo, A., and Lopez-Otin, C. (1998). Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *The Journal of biological chemistry* 273, 16816-16823.
- Sasaki, M., Miyakoshi, M., Sato, Y., and Nakanuma, Y. (2010). Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Lab. Invest.* 90, 835-843.
- Sasaki, M., Miyakoshi, M., Sato, Y., and Nakanuma, Y. (2012). A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 32, 487-499.
- Scorilas, A., Fotiou, S., Tsiambas, E., Yotis, J., Kotsiandri, F., Sameni, M., Sloane, B.F., and Talieri, M. (2002). Determination of cathepsin B expression may offer additional prognostic information for ovarian cancer patients. *Biol. Chem.* 383, 1297-1303.
- Sekharam, M., Nasir, A., Kaiser, H.E., and Coppola, D. (2003). Insulin-like growth factor 1 receptor activates c-SRC and modifies transformation and motility of colon cancer in vitro. *Anticancer Res.* 23, 1517-1524.
- Sevenich, L., Schurigt, U., Sachse, K., Gajda, M., Werner, F., Muller, S., Vasiljeva, O., Schwinde, A., Klemm, N., Deussing, J., *et al.* (2010). Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2497-2502.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.
- Shaw, E., and Dean, R.T. (1980). The inhibition of macrophage protein turnover by a selective inhibitor of thiol proteinases. *The Biochemical journal* 186, 385-390.
- Shay, J.W., and Roninson, I.B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23, 2919-2933.
- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.
- Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10, 197-206.

- Sivaraman, J., Nägler, D.K., Zhang, R., Menard, R., and Cygler, M. (2000). Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J. Mol. Biol.* *295*, 939-951.
- Sloane, B.F., Sameni, M., Podgorski, I., Cavallo-Medved, D., and Moin, K. (2006a). Functional imaging of tumor proteolysis. *Annual review of pharmacology and toxicology* *46*, 301-315.
- Sloane, B.F., Sameni, M., Podgorski, I., Cavallo-Medved, D., and Moin, K. (2006b). Functional imaging of tumor proteolysis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *46*, 301-315.
- Stichel, C.C., and Luebbert, H. (2007). Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiol. Aging* *28*, 1507-1521.
- Stoch, S.A., Zajic, S., Stone, J.A., Miller, D.L., van Bortel, L., Lasseter, K.C., Pramanik, B., Cilissen, C., Liu, Q., Liu, L., *et al.* (2012). Odanacatib, a Selective Cathepsin K inhibitor to Treat Osteoporosis: Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics - Results from Single Oral Dose Studies in Healthy Volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*
- Sulpizio, S., Franceschini, N., Piattelli, A., Di Sebastiano, P., Innocenti, P., and Selvaggi, F. (2012). Cathepsins and pancreatic cancer: The 2012 update. *Pancreatology* *12*, 395-401.
- Szpaderska, A.M., and Frankfater, A. (2001). An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res.* *61*, 3493-3500.
- Tatti, M., Motta, M., Di Bartolomeo, S., Scarpa, S., Cianfanelli, V., Cecconi, F., and Salvioli, R. (2012). Reduced cathepsins B and D cause impaired autophagic degradation that can be almost completely restored by overexpression of these two proteases in Sap C-deficient fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 5159-5173.
- Therrien, C., Lachance, P., Sulea, T., Purisima, E.O., Qi, H., Ziomek, E., Alvarez-Hernandez, A., Roush, W.R., and Menard, R. (2001). Cathepsins X and B can be differentiated through their respective mono- and dipeptidyl carboxypeptidase activities. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 2702-2711.
- Tolosa, E., Li, W., Yasuda, Y., Wienhold, W., Denzin, L.K., Lautwein, A., Driessen, C., Schnorrer, P., Weber, E., Stevanovic, S., *et al.* (2003). Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *The Journal of clinical investigation* *112*, 517-526.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* *1824*, 68-88.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., *et al.* (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal* *5*, 2503-2512.

- Vadivel, K., and Bajaj, S.P. (2012). Structural biology of factor VIIa/tissue factor initiated coagulation. *Front. Biosci.* *17*, 2476-2494.
- Vasiljeva, O., Papazoglou, A., Kruger, A., Brodoefel, H., Korovin, M., Deussing, J., Augustin, N., Nielsen, B.S., Almholt, K., Bogyo, M., *et al.* (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res.* *66*, 5242-5250.
- Vernet, T., Tessier, D.C., Chatellier, J., Plouffe, C., Lee, T.S., Thomas, D.Y., Storer, A.C., and Menard, R. (1995). Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *J. Biol. Chem.* *270*, 16645-16652.
- Vizin, T., Christensen, I.J., Nielsen, H.J., and Kos, J. (2012). Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Radiol Oncol* *46*, 207-212.
- Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H.A., Kalluri, R., and Shi, G.P. (2006). Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J. Biol. Chem.* *281*, 6020-6029.
- Wang, J., Chen, L., Li, Y., and Guan, X.Y. (2011). Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* *6*, e24967.
- Wendt, W., Zhu, X.R., Lubbert, H., and Stichel, C.C. (2007). Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Exp. Neurol.*
- Wersto, R.P., Rosenthal, E.R., Seth, P.K., Eissa, N.T., and Donahue, R.E. (1998). Recombinant, replication-defective adenovirus gene transfer vectors induce cell cycle dysregulation and inappropriate expression of cyclin proteins. *J. Virol.* *72*, 9491-9502.
- White, E., and Lowe, S.W. (2009). Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev.* *23*, 784-787.
- Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* *74*, 589-607.
- Wickman, G., Julian, L., and Olson, M.F. (2012). How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ.* *19*, 735-742.
- Wille, A., Heimburg, A., Gerber, A., Reisenauer, A., Welte, T., and Buhling, F. (2002). Functional consequences of cathepsin L deficiency in human lung epithelial cells. *Biol. Chem.* *383*, 1291-1296.
- Willstätter, R., and Bamann, E. (1929). Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* *180*, 127-143.
- Wright, W.E., and Shay, J.W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat. Med.* *6*, 849-851.

- Wyczalkowska-Tomasik, A., and Paczek, L. (2012). Cathepsin B and L activity in the serum during the human aging process: cathepsin B and L in aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* *55*, 735-738.
- Yan, J.A., Xiao, H., Ji, H.X., Shen, W.H., Zhou, Z.S., Song, B., Chen, Z.W., and Li, W.B. (2010). Cathepsin L is associated with proliferation and clinical outcome of urothelial carcinoma of the bladder. *The Journal of international medical research* *38*, 1913-1922.
- Yin, S., Dong, Y., Li, J., Lu, J., and Hu, H. (2011). Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose induces senescence-like terminal S-phase arrest in human hepatoma and breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* *50*, 592-600.
- Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavares, S., Arakawa, S., Shimizu, S., and Watt, F.M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* *23*, 798-803.
- Zelobowska, K., Gumprecht, J., and Grzeszczak, W. (2009). Mitogenic potency of insulin glargine. *Endokrynol. Pol.* *60*, 34-39.
- Zhao, G., Cui, J., Zhang, J.G., Qin, Q., Chen, Q., Yin, T., Deng, S.C., Liu, Y., Liu, L., Wang, B., *et al.* (2011). SIRT1 RNAi knockdown induces apoptosis and senescence, inhibits invasion and enhances chemosensitivity in pancreatic cancer cells. *Gene Ther.* *18*, 920-928.
- Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* *12*, 2997-3007.

H Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die entweder direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Außerordentlich dankbar bin ich Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar, Leiterin des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie, für die Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU.

Frau Prof. Dr. Marianne Jochum, Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und ihre großzügige finanzielle sowie fachliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Dorit Nägler für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und das angenehme Arbeitsklima. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, und auf Ihre Unterstützung konnte ich mich jederzeit verlassen.

Prof. Dr. Christoph Peters und Prof. Dr. Thomas Reinheckel von der Universität Freiburg danke ich für die Bereitstellung der murinen embryonalen Fibroblasten, die sich zu einem essentiellen Bestandteil meiner Arbeit entwickelt haben.

PD Dr. Alexander Faussner bin ich zu großem Dank verpflichtet, da er in den Wirren der Institutsauflösung mich, als „obdachlos“ gewordenen Doktoranden, für die letzten Monate meiner Forschung in seinem Labor aufgenommen hat und mir so den Abschluss meiner experimentellen Arbeiten ermöglichte.

Für die Untertützung, insbesondere in Sachen Computer-Hard- und -Software, möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Christian Sommerhoff bedanken, und selbstverständlich auch für seinen unschätzbaren intellektuellen Input zu meiner Forschung.

Den weiteren Mitgliedern der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, PD Dr. Peter Neth, PD Dr. Christian Ries, PD Dr. Beatrice Bachmeier, Dr. Cornelia Gippner-Steppert und Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger danke ich für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und ihre beständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. PD Dr. Peter Neth danke ich insbesondere für Leitung und Organisation des Doktorandenseminars.

Annemarie Oettl, Heidrun Grondinger, Erika Falk und Ruza Hell danke ich ganz herzlich für ihre exzellente technische sowie moralische Untertützung.

Karola Rügamer-Biese und Evelyn Themel möchte ich für die professionelle Hilfe in allen Fragen der Bürokratie und die nette Atmosphäre im Sekretariat danken.

Meiner Vorgängerin, Dr. Annette Lechner, danke ich für die Einarbeitung im Labor und für ihre Hilfsbereitschaft bei all meinen anfänglichen Problemchen.

Und auch meinen weiteren Kollegen aus der Arbeitsgruppe, Monika Cichon, Maximilian Fruth, Thea Bunsen und Simon Schuster möchte ich für die hervorragende Zusammenarbeit und ihre gute Laune danken.

Zuletzt möchte ich noch allen anderen Mitarbeitern und Kollegen danken, die nicht in der Arbeitsgruppe Nägler beschäftigt waren, auf deren Unterstützung ich mich aber ebenso stets verlassen konnte und die alle zu der sehr angenehmen und familiären Atmosphäre im Institut beigetragen haben. Gesondert erwähnen möchte ich hier Stefan Simon, Steffen Schüssler, Maresa Grundhuber, Dr. Larisa Ring, Dr. Iris Peröbner, Dr. Jasmin Leschner, Dr. Jens Feierler, Peter Killian, Frank Brennfleck und Raphael Metzler. Die gemeinsamen Abende im Institut, bei denen die Wissenschaft nicht immer im Vordergrund stand, genauso wie die kollektiven Konferenzen möchte ich nicht missen.