

Dissertation
an der
Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isolation und molekulare Charakterisierung
des Apoptose-induzierenden
Metastasensuppressors C33/CD82**

vorgelegt von

Nicole Schönfeld
aus Bad Sobernheim

im Juni 2002

Tag der Einreichung: 24. Juni 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2003

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Charles David

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Boshart

Sonderberichterstatter: Dr. Stefan Grimm

meinen Eltern

Unser Verständnis der Welt ist aus unzähligen Schichten errichtet.

**Jede Schicht verdient erforscht zu werden,
solange wir nicht vergessen, dass es nur eine von vielen ist.**

Wenn wir alles wüssten, was man von einer Schicht wissen kann

**– ein höchst unwahrscheinlicher Fall –,
so würde uns das nicht viel über den Rest belehren.**

Erwin Chargaff

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1998 bis Juni 2002 in der selbständigen Nachwuchsgruppe „Programmierter Zelltod“ (Leiter: Dr. Stefan Grimm) am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried angefertigt.

Danken möchte ich

- Herrn Dr. Stefan Grimm für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine sehr engagierte Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen konstruktiven Ideen und Anregungen,
- Herrn Prof. Dr. Charles David für seine Bereitschaft, diese Dissertation an der Universität zu vertreten,
- Herrn Dr. Manuel Bauer für seine gute Betreuung, seine Hilfsbereitschaft und für die vielen guten Tipps und Hinweise,
- der gesamten Arbeitsgruppe für die nette und anregende Zusammenarbeit und den Spaß, den wir zusammen hatten: Ulla, die mir den Einstieg in die Zellbiologie sehr erleichtert hat, Frank, für zahlreiche technische Tipps und die Weiterführung des Projektes, Erik und Andreas, die meine unmittelbare Nachbarschaft „tapfer“ ertragen haben, Timur, Alexis, Thomas, Jasmina, Sandra und Volker; und nicht zuletzt auch Andrea und Rita, die stets gute Laune verbreitet haben,
- Frau Dr. Andrea Gnirke und anderen Mitarbeitern von Xantos Biomedicine für ihre guten Ideen und tatkräftige Unterstützung,
- der Arbeitsgruppe Ullrich für Benutzung des FACS-Gerätes und speziell Reimar Abraham für seine Geduld beim „troubleshooting“,
- Herrn Dr. Takao Sakai, Frau Dr. Ute Reuning und Frau Dr. Ulla Magdolen für ihre Hilfestellung bei den Adhäsions- und Migrationsexperimenten,
- der Donnerstag-Abend-Badminton-Truppe, Marion, Tanja, Matthias, Andreas, Thomas und Volker, für viel Spass und regelmäßigen Muskelkater.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, Irma und Dieter Schönfeld, meinem Freund Georg Wagner und meinen Freundinnen und Freunden für ihre ermutigenden Worte und ihre phantastische Unterstützung!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen	v
Tabellen	vii
Abkürzungen	viii
1 Einleitung.....	1
1.1 Merkmale der Apoptose	1
1.2 Molekulare Grundlagen der Apoptose.....	1
1.2.1 Rezeptor-vermittelte Apoptoseinduktion	2
1.2.2 Apoptoseinduktion durch direkte Aktivierung der Mitochondrien	4
1.2.3 Caspasen – zentrale Mediatoren der Apoptose	11
1.3 Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus	13
1.3.1 Apoptose im gesunden Organismus	13
1.3.2 Fehlregulierte Apoptose bei Erkrankungen.....	14
1.4 Tumorbildung und Metastasierung.....	14
1.4.1 Apoptose bei der Tumor- und Metastasenbildung	15
1.4.2 Tumor- und Metastasensuppressoren	17
1.5 Der Metastasensuppressor CD82/KAI1/C33.....	19
1.5.1 Die Wirkung von CD82/KAI1 als Metastasensuppressor	19
1.5.2 Die Regulation der CD82/KAI1-Expression.....	20
1.5.3 Die zellbiologische Bedeutung von CD82/KAI1	20
1.6 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Materialien	23
2.1 Chemikalien	23
2.2 Molekularbiologische Reagenzien.....	25
2.2.1 Antibiotika und biochemische Reagenzien	25
2.2.2 Restriktionsenzyme	26
2.2.3 Andere Enzyme.....	26
2.2.4 Proteinase-Inhibitoren.....	26
2.2.5 Monoklonale Antikörper.....	27
2.2.6 Molekulargewichtsstandards.....	27

2.3	Zellkulturmedien	27
2.4	Oligonukleotide	27
2.5	Kits	29
2.6	Plasmide	29
2.7	Geräte	32
3	Methoden	33
3.1	Prokaryontische Zellkultur	33
3.1.1	Prokaryontische Zellkulturbedingungen	33
3.1.2	Lagerung von Zellen	33
3.1.3	Bakterienstämme.....	33
3.1.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	33
3.1.5	Transformation von Bakterienzellen	34
3.2	Eukaryontische Zellkultur	35
3.2.1	Eukaryontische Zellkulturbedingungen	35
3.2.2	Lagerung eukaryontischer Zellen	35
3.2.3	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	36
3.2.4	Herstellung von HeLa-Zellen ohne mitochondriale DNA (p0-Zellen).....	38
3.3	DNA-Arbeitsmethoden	38
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	38
3.3.2	Überprüfung der DNA-Konzentration und Reinheit	40
3.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	41
3.3.5	Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	42
3.3.6	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisierung	42
3.3.7	Präzipitation von Nukleinsäuren	42
3.3.8	Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA.....	42
3.3.9	Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.3.10	DNA-Sequenzierung.....	43
3.4	RNA-Arbeitsmethoden	44
3.4.1	RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen	44
3.4.2	Reverse Transkription.....	44
3.5	Apoptose-Tests	45
3.5.1	DNA-Leiter	45
3.5.2	Nachweis hypodiploider DNA	45
3.5.3	Phosphatidylserin-Detektion.....	46

3.6	Proteinchemische Methoden	47
3.6.1	Herstellung von Zellextrakten.....	47
3.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
3.6.4	Western-Blot.....	50
3.6.5	Chemilumineszenz-Detektion von Proteinen.....	50
3.6.6	Ponceau S-Färbung von Proteinen.....	51
3.7	Reportergentests	51
3.7.1	Luciferase-Test.....	51
3.7.2	β -Galactosidase-Test (CPRG).....	51
3.8	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials	52
3.9	Bestimmung der Superoxidanion-Bildung	52
3.10	Analyse und Anreicherung CD82-positiver Zellen	53
3.10.1	Bestimmung der CD82-Expression.....	53
3.10.2	Anreicherung von Zellen mit starker Expression von CD82.....	53
3.11	Bestimmung der Zelladhäsion und -migration	54
3.11.1	Nachweis der Zelladhäsion an Laminin.....	54
3.11.2	Nachweis der haptotaktischen Motilität auf Fibronectin.....	55
3.11.3	MTT-Test zur Zellzahlbestimmung.....	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Screening nach dominant Apoptose-induzierenden Genen	57
4.1.1	Bekannte Apoptoseinduzierer (Positivkontrollen).....	58
4.1.2	Als proapoptotisch identifizierte bekannte Gene.....	58
4.1.3	Uncharakterisierte Apoptose-induzierende Sequenzen.....	64
4.1.4	Auswahl des Metastasensuppressorgens C33 für weitere Untersuchungen..	67
4.2	Charakterisierung der proapoptotischen Aktivität von C33/CD82	69
4.2.1	C33/CD82-Apoptose wird durch Caspasen vermittelt.....	69
4.2.2	C33/CD82-Apoptose erfolgt durch Aktivierung der Mitochondrien.....	72
4.3	Funktionelle Eingrenzung der proapoptotischen Aktivität von C33/CD82	75
4.3.1	Spezifität der C33/CD82-induzierten Apoptose.....	75
4.3.2	Weitere Mitglieder der Tetraspanin-Familie induzieren Apoptose.....	77
4.3.3	Der cytoplasmatische C-Terminus und die große extrazelluläre Schleife sind für C33/CD82-Apoptose nicht erforderlich.....	79
4.3.4	Ein Effekt des EGF-Rezeptors auf C33/CD82-induzierte Apoptose ist nicht nachweisbar.....	82

4.3.5	Die Interaktion von C33/CD82 mit Proteinkinase C ist vermutlich nicht die Ursache der Apoptoseinduktion	84
4.3.6	C33/CD82-Apoptose ist unabhängig von Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix-Interaktionen	85
4.4	Bedeutung der C33/CD82-Expression für Tumorzellen.....	89
4.4.1	C33/CD82 induziert Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien	89
4.4.2	C33/CD82 sensitiviert Prostatakarzinomzellen für Cycloheximid-induzierte Apoptose.....	91
4.4.3	C33/CD82 induziert Apoptose unter moderat hypoxischen Bedingungen...	94
4.5	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bei der C33/CD82-induzierten Apoptose	95
4.5.1	Im Verlauf der C33/CD82-induzierten Apoptose werden reaktive Sauerstoffintermediate gebildet	95
4.5.2	Die ROI-Bildung erfolgt unabhängig von der mitochondrialen Elektronentransportkette.....	98
5	Diskussion.....	101
5.1	Screening nach dominanten proapoptotischen Genen.....	101
5.1.1	Neu-identifizierte proapoptotische Gene.....	101
5.1.2	Vergleich mit alternativen Screeningmethoden.....	103
5.2	C33/CD82 - Ein Metastasensuppressor induziert Apoptose	105
5.3	C33/CD82 hat wenigstens drei voneinander unabhängige metastasierungsrelevante Funktionen.....	111
5.4	Die Bedeutung der C33/CD82-Apoptose für die Metastasierung.....	115
6	Zusammenfassung.....	121
7	Literatur	123
Publikationen		147
Lebenslauf		148

Abbildungen

Abb. 1.1	Strukturelle Veränderungen bei der Apoptose	2
Abb. 1.2	Pro- und antiapoptotische Signaltransduktion durch den TNF-Rezeptor	4
Abb. 1.3	Vereinfachte Darstellung der wichtigsten Wege der Apoptoseinduktion:.....	5
Abb. 1.4	Modell zur Wirkungsweise der Bcl-2-Homologa.....	8
Abb. 1.5	Überblick über die mitochondrialen Veränderungen im Verlauf der Apoptose.....	10
Abb. 1.6	Die Caspasen: Mechanismus der Aktivierung und phylogenetischer Überblick	12
Abb. 1.7	Allgemeines Modell zur Progression von Tumoren und Entwicklung von Metastasen.....	16
Abb. 4.1	Phänotypischer Vergleich von C33- und kontrolltransfizierten 293T-Zellen....	68
Abb. 4.2	Inhibition der C33-Apoptose durch p35 und Nachweis der DNA-Degradation in 293T-Zellen.....	70
Abb. 4.3	Spaltung von PARP und Degradation der chromosomalen DNA in C33-transfizierten HeLa-Zellen.....	71
Abb. 4.4	C33 induziert den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ und die Freisetzung von Cytochrom c	73
Abb. 4.5	Inhibition der CD82-Apoptose durch Bcl-2, Bcl-x _L und XIAP, nicht aber durch IAP-2.....	74
Abb. 4.6	Die Apoptoseinduktion durch C33/CD82 ist sehr spezifisch	76
Abb. 4.7	Dendrogramm der Tetraspanin-Superfamilie.....	77
Abb. 4.8	Apoptoseinduktion durch andere Mitglieder der Tetraspanin-Superfamilie	78
Abb. 4.9	Apoptoseinduktion durch C33-Deletionsmutanten.....	80
Abb. 4.10	Eine Inhibition der C33-Apoptose durch cotransfizierte Zelloberflächenrezeptoren ist nicht nachweisbar	83

Abb. 4.11	CD82-Apoptose kann durch Cotransfektion von Integrinen nicht gehemmt werden.....	86
Abb. 4.12	Die Expression von CD82 beeinflusst weder die Adhäsion von PC3-Zellen an Laminin noch deren Motilität auf Fibronektin.....	87
Abb. 4.13	C33 induziert Apoptose in nicht-adhärenen Zellen.....	88
Abb. 4.14	Expressionsniveau von CD82 in unbehandelten PC3-, HeLa- und MCF-7-Zellen.....	89
Abb. 4.15	Apoptoseinduktion in Prostata-, Cervix- und Mammakarzinom-Zelllinien.....	90
Abb. 4.16	CD82-Expression in stabil transfizierten PC3-Zellen.....	92
Abb. 4.17	CD82 sensitiviert PC3-Zellen spezifisch für Cycloheximid-induzierte Apoptose.....	93
Abb. 4.18	C33 induziert Apoptose unter hypoxischen Bedingungen.....	95
Abb. 4.19	C33 vermittelt die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten.....	96
Abb. 4.20	Sauerstoffradikal-inaktivierende Substanzen und Enzyme vermindern C33-Apoptose.....	97
Abb. 4.21	C33 initiiert Apoptose unabhängig von der Funktionalität der Atmungskette..	98
Abb. 4.22	C33 induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in HeLa $\rho 0$ -Zellen.....	99
Abb. 5.1	Postulierter Mechanismus der Apoptoseinduktion durch den Metastasensuppressor C33/CD82.....	107
Abb. 5.2	Übersicht über verschiedene potentiell metastasierungsrelevante Funktionen von C33/CD82.....	112
Abb. 5.3	Modell der Bedeutung der C33/CD82-Apoptose unter hypoxischen Bedingungen für die Metastasierung.....	116
Abb. 5.4	Modell der proapoptotischen Aktivität von C33/CD82 (Modell).....	119

Tabellen

Tab. 3.1	Zelllinien, Kulturmedien und Transfektionsmethoden	37
Tab. 4.1	Apoptose-induzierende Klone I	59
Tab. 4.2	Apoptose-induzierende Klone II	63
Tab. 4.3	Apoptose-induzierende Klone III	65
Tab. 4.4	Nachweis der Apoptoseinduktion ausgewählter Klone	66
Tab. 5.1	Übersicht über die als proapoptotisch identifizierten, aber bereits bekannten Gene	102

Abkürzungen

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Ant1	Adenin Nukleotid Translokase 1
APAF	Apoptotischer Protease-aktivierender Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bcl	B-Zell-Lymphom
β-Gal	β-Galaktosidase
BH	Bcl-2 homologe Domänen
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CCCP	Carbonyl-cyanid-m-chlorphenylhydrazon
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonium]-1 propan sulfonat
CMV	Cytomegalievirus
CPRG	Chlorphenolrot-β-D-galaktopyranosid
CT-FKS	<i>charcoal-treated</i> (Aktivkohle behandeltes) FKS
DD	<i>death domain</i> (Todes-Domäne)
DED	<i>death effector domain</i> (Todes-Effektor-Domäne)
DiOC ₆ (3)	3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylnitril)-tetraacetat
EGFP	<i>enhanced GFP</i> (stark fluoreszierendes GFP)

EGFR	EGF-Rezeptor
EtOH	Ethanol
EYFP	<i>enhanced YFP</i> (stark fluoreszierendes YFP)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> (Durchflusscytometer)
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todes-Domäne (<i>DD</i>)
Fas	FS7-assoziiertes Zelloberflächen-Antigen (APO-1, CD95)
FasL	Fas-Ligand
FKS	Serum von Kälberföten
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
HE	Hydroethidin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish-</i> (Meerrettich-)Peroxidase
IAP	Inhibitor der Apoptose-Protein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertoni-Medium
Luc	Luciferase
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure
mRNA	<i>messenger-</i> (Boten-)Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
Nedd2	Caspase 2
Neo	Neomycin
NF	Nukleärer Faktor
NP-40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Puffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PE	Phycoerythrin

PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PT-Pore	<i>permeability transition pore</i> („Permeabilitätsübergangs-“Pore)
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Reaktive Sauerstoffintermediate
RT	Raumtemperatur
rT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline</i> mit 0,05 % Tween20
TLCK	N α -p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethyl-Keton
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tiron	4,5-Dihydroxy-1,3-benzen-disulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein mit Todes-Domäne (<i>DD</i>)
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheiten
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)
zVAD	Z-Val-Ala-Asp (oMe)-Fluormethylketon

1 Einleitung

1.1 Merkmale der Apoptose

Jede Sekunde sterben mehrere Millionen überzählige, gealterte oder beschädigte Zellen des menschlichen Körpers durch Apoptose (Kroemer et al., 1998). Das Zusammenspiel von Zelltod (Apoptose), Zellteilung (Mitose) und Differenzierung ist verantwortlich für die komplexen Um- und Aufbauprozesse, die unseren Körper hervorgebracht haben und fortwährend erneuern. Störungen bei diesen Prozessen haben schwerwiegende Konsequenzen: sie bedingen Fehlbildungen von Organen, die Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs. Um diese Störungen zu vermeiden und das Auftreten von Fehlbildungen und Erkrankungen zu minimieren, sind alle beteiligten Prozesse genau kontrolliert, auch die Apoptose.

Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten des Zelltods: die Nekrose und die Apoptose. Nekrose wird durch Aktivierung des Komplementsystems, Infarkte oder bestimmte Chemikalien ausgelöst und führt zur Ausschüttung des Zellinhalts in die Umgebung der Zelle. Dies führt häufig zu inflammatorischen Reaktionen und damit zur Schädigung des umgebenden Gewebes (Afanas'ev et al., 1986; Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998). Im Gegensatz zur Nekrose, die passiv verläuft, ist die Apoptose ein aktiver, stringent regulierter Prozess und wird daher auch als programmierter, physiologischer oder regulierter Zelltod bezeichnet. Im Verlauf der Apoptose werden definierte Signaltransduktionswege aktiviert: die Zellbestandteile werden in charakteristischer Weise zerkleinert, in sogenannte apoptotische Körperchen verpackt und schließlich durch Zellen des Immunsystems phagozytiert, so dass Entzündungsreaktionen vermieden werden (Voll et al., 1997). Diese komplexen morphologischen Veränderungen, die in Abbildung 1.1 dargestellt sind, wurden erstmalig 1972 von Kerr et al. zusammenfassend beschrieben und mit dem Begriff „Apoptose“ belegt (Kerr et al., 1972).

1.2 Molekulare Grundlagen der Apoptose

Die Apoptose ist ein sehr geordneter Prozess, der durch bestimmte Proteasen, die Caspasen, vermittelt wird. Diese aktivieren sich gegenseitig und amplifizieren auf diese Weise das proapoptotische Signal. Darüber hinaus spalten sie zahlreiche Strukturproteine und Enzyme und bedingen so die charakteristischen morphologischen Veränderungen.

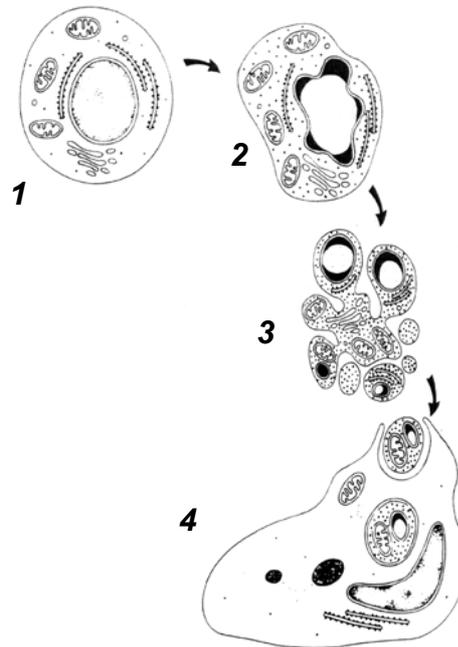


Abbildung 1.1 Strukturelle Veränderungen bei der Apoptose

Die Abbildung zeigt charakteristische Veränderungen einer Zelle im Verlauf der Apoptose (nach Kerr et al., 1994). Zunächst schrumpft die Zelle, das Cytoplasma und das Chromatin kondensieren (2). Im weiteren Verlauf (3) wird der Zellkern fragmentiert (Karyorhexis) und Vesikel werden von der Cytoplasmamembran abgeschnürt. Diese sogenannten „apoptotischen Körperchen“ werden von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert und durch lysosomale Enzyme verdaut.

Das Programm der Apoptose kann grundsätzlich über zwei verschiedene Wege initiiert werden: durch extrazelluläre Liganden wie TNF oder FasL bei der extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Apoptoseinduktion oder aber durch bestimmte intrazelluläre (intrinsische) Signale, die spezifische mitochondriale Veränderungen hervorrufen und auf diese Weise zur Aktivierung von Caspasen führen. Beide Wege werden im Folgenden vorgestellt, um einen Überblick darüber zu geben, wie die Apoptoseinduktion durch den in dieser Arbeit beschriebenen, in der Cytoplasmamembran lokalisierten Metastasensuppressor C33/CD82 prinzipiell erfolgen könnte.

1.2.1 Rezeptor-vermittelte Apoptoseinduktion

Im Jahr 1975 beobachtete man die Zerstörung bestimmter Tumorzellen nach der Zugabe eines bestimmten, von Makrophagen produzierten Faktors: des Tumor-Nekrose-Faktors TNF (Carswell et al., 1975). Heute weiß man, dass TNF an bestimmte Rezeptoren an der

Zelloberfläche bindet und auf diese Weise Apoptose induziert. Diese Rezeptoren sind Teil der TNF-Rezeptorfamilie. Sechs ihrer Mitglieder induzieren Apoptose, die übrigen 20 vermitteln Proliferations-, Überlebens- und Differenzierungssignale (Locksley et al., 2001). Die am besten charakterisierten apoptosevermittelnden Rezeptoren, sogenannte Zelltod-Rezeptoren, sind der TNF-Rezeptor I (TNFR1/TNFRSF1A/p55/CD120a) und der Fas (TNFRSF6/APO-1/CD95)-Rezeptor (Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley et al., 2001). Exemplarisch sei hier die Aktivierung des TNFR1 durch TNF beschrieben (vergleiche Abbildung 1.2): TNF wird von Lymphocyten und Makrophagen zunächst als Zelloberflächenmolekül gebildet. Diese Proform ist ebenso wie die trunkeerte lösliche Form als Ligand aktiv und bindet den TNFR1. Aufgrund seiner trimeren Struktur induziert TNF die Trimerisierung und damit die Aktivierung seines korrespondierenden Rezeptors (Locksley et al., 2001). Durch die dadurch bedingte Assoziation der intrazellulären Domänen der trimerisierten Rezeptoren, lagern sich – wiederum drei – Adaptermoleküle an den Komplex. Diese unterscheiden sich je nach Zustand der Zelle: Bei einer antiapoptotischen, proinflammatorischen, immunmodulatorischen Antwort induziert das Adaptermolekül TRAF2 die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1. Bei einer proapoptotischen Signalkaskade wird dagegen, wie in Abbildung 1.2 beschrieben, anstelle von TRAF2 das Adaptermolekül TRADD an den Rezeptorkomplex rekrutiert (Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley et al., 2001). Dieses rekrutiert mit FADD ein weiteres Molekül an den aktivierten Rezeptor. FADD verfügt über eine sogenannte „Todes-Effektor-Domäne“, wie sie auch in der Prodomäne von Procaspase-8 zu finden ist, und vermittelt so die Anbindung der Procaspase an den sogenannten Zelltod-induzierenden Signalkomplex (Bratton et al., 2000; Chinnaiyan et al., 1996). Dieser enthält aufgrund seiner trimeren Struktur mehrere Procaspase-8-Moleküle, die sich, bedingt durch die räumliche Nähe, gegenseitig aktivieren: es entsteht aktive Caspase-8. Diese verlässt den Signalkomplex, aktiviert weitere Caspasen und leitet so, wie in Abbildung 1.3 beschrieben, das proapoptotische Signal weiter (Ashkenazi und Dixit, 1998; Golstein et al., 1991; Medema et al., 1997; Muzio et al., 1998). Aktive Caspase-8 kann nicht nur direkt weitere Caspasen aktivieren, sondern aktiviert – wenigstens in einigen Fällen – auch den mitochondrialen Weg der Apoptoseinduktion und zwar durch die Spaltung des Bcl-2-Homologs Bid (vergleiche Abbildung 1.3) (Krammer, 2000; Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Strasser et al., 2000). Auf diese Weise wird nicht nur das proapoptotische Signal verstärkt, sondern es werden auch antiapoptotische Signale, z.B. durch Ausschüttung von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien, eliminiert (Green, 2000).

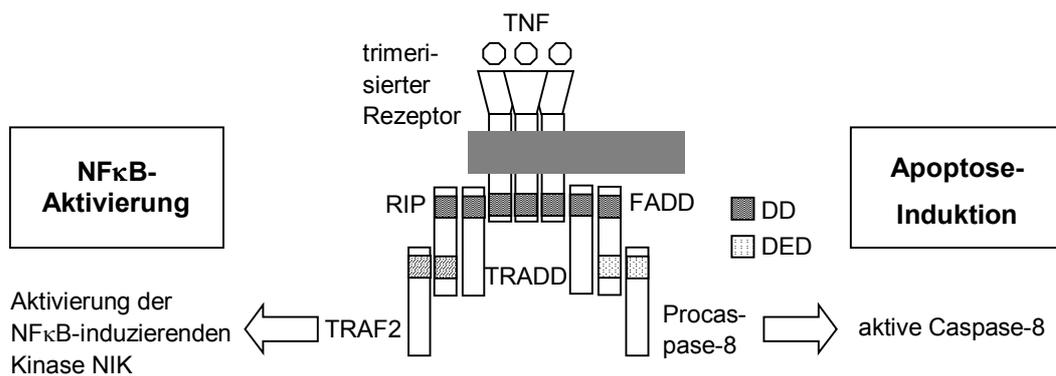


Abbildung 1.2 Pro- und antiapoptotische Signaltransduktion durch den TNF-Rezeptor TNFR1

Durch die Anbindung des trimeren Liganden TNF trimerisiert der in der Cytoplasmamembran lokalisierte Rezeptor und ermöglicht die Anlagerung von Adapterproteinen wie TRADD. Diese erfolgt über spezifische, durch die „Todes-Domänen“ (*death domains*, DD) vermittelte Protein-Protein-Interaktionen. TRADD selbst ist vergleichbar mit einem Adapter, an den sich weitere Moleküle anlagern können. Abhängig vom Zelltyp kann an dieser Stelle – je nach Anwesenheit weiterer Stimuli – entweder eine pro- oder aber eine antiapoptotische Signalweiterleitung erfolgen: bei der antiapoptotischen (linke Hälfte des Schaubilds) lagert sich beispielsweise, vermittelt durch RIP, das Molekül TRAF2 an, welches die Aktivierung der NFκB-induzierenden Kinase NIK und damit letztlich die Aktivierung von NFκB bewirkt. Bei der proapoptotischen Signaltransduktion (rechte Hälfte des Schaubilds) wird der Adapter FADD an den aktivierten Komplex rekrutiert. Dieser ermöglicht über Proteininteraktionen der „Todes-Effektor-Domänen“ (*death effector domains*, DED) die Anbindung von Procaspase-8. Pro Rezeptorkomplex werden dabei mehrere Procaspase-8-Moleküle rekrutiert, die sich durch die räumliche Nähe gegenseitig aktivieren (Ashkenazi und Dixit, 1998).

1.2.2 Apoptoseinduktion durch direkte Aktivierung der Mitochondrien

Die Mitochondrien sind zentrale Mediatoren des zweiten wichtigen Apoptose-Signaltransduktionswegs, der in Abbildung 1.3 B skizziert ist. Sie können auf verschiedenste Weise aktiviert werden und zeigen charakteristische Veränderungen im Verlauf dieser Aktivierung. Infolgedessen kommt es beispielsweise zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum ins Cytoplasma, wo diese dann Caspasen aktivieren.

Von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von Mitochondrien sind die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Man findet sie im Cytoplasma, aber auch assoziiert an Membranen, wie die äußere Mitochondrienmembran, die äußere Kernmembran oder die Membran des endoplasmatischen Reticulums. Man kennt bereits 15 verschiedene Mitglieder der Familie (Adams und Cory, 1998; Strasser et al., 2000). Einige von ihnen sind proapoptotisch und führen zur Aktivierung der Mitochondrien – beispielsweise Bax, Bad, Bid, Bim und Bmf –, andere wie Bcl-2 oder Bcl-x_L sind antiapoptotisch und verhindern nahezu jegliche Aktivierung der

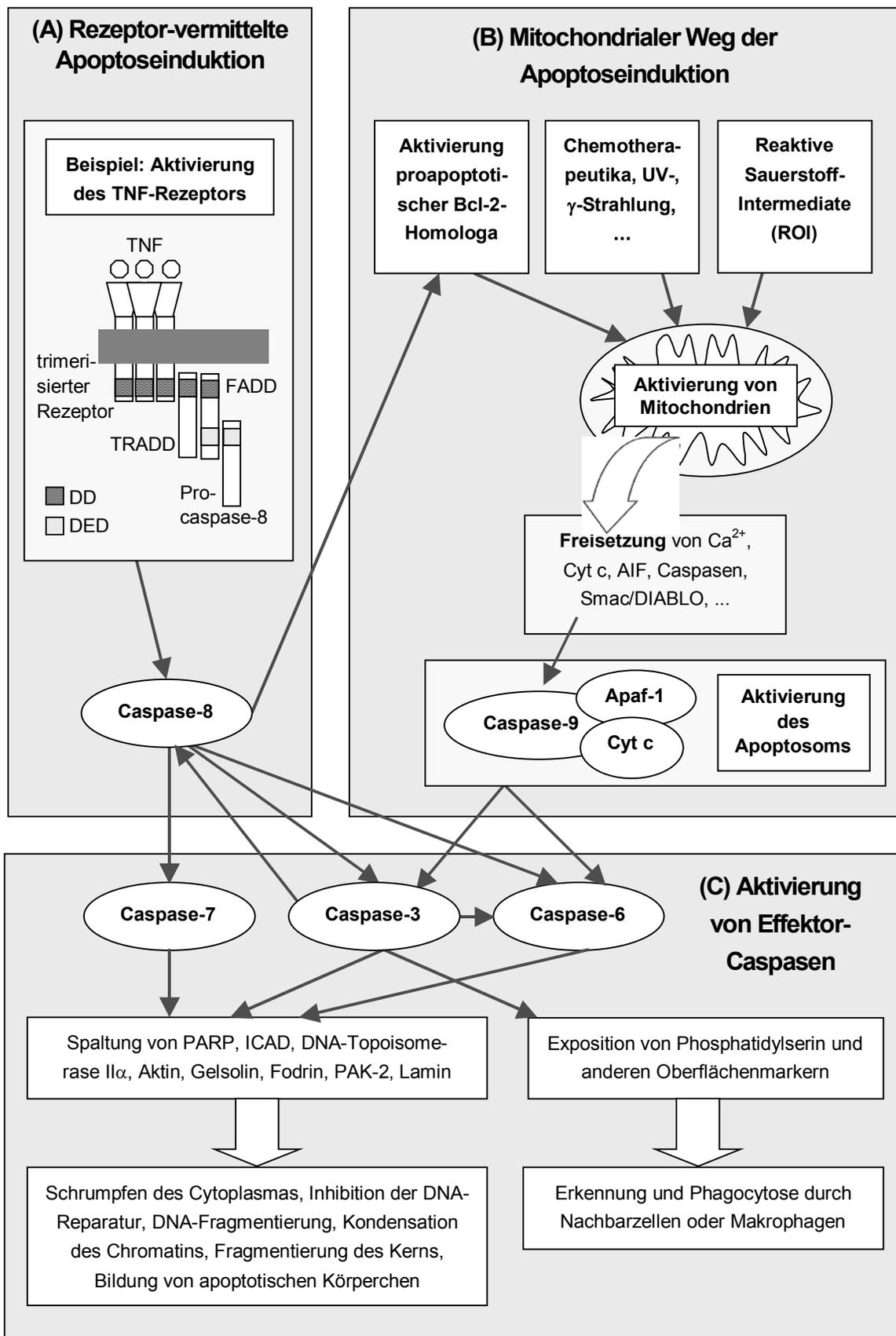


Abbildung 1.3 Vereinfachte Darstellung der wichtigsten Wege der Apoptoseinduktion: Rezeptor-

vermittelte Apoptose (A) und mitochondrialer Weg der Apoptoseinduktion (B). Beide Wege konvergieren in der Aktivierung von Effektor-Caspasen (C) und führen zum typischen apoptotischen Phänotyp.

(A) Der Rezeptor-vermittelte Weg führt, wie in Abbildung 1.2 beschrieben, zur Aktivierung von Procaspase-8. (B) Der mitochondriale Weg der Apoptoseinduktion basiert auf der Aktivierung von Mitochondrien. Diese erfolgt entweder direkt durch reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) oder durch Chemikalien. Chemikalien, UV- und γ -Strahlung können auch indirekt, durch Erzeugung von DNA-Schäden und dadurch bedingte Aktivierung von p53, Mitochondrien aktivieren. Eine weitere Möglichkeit der Mitochondrien-Aktivierung besteht in der Aktivierung proapoptotischer Bcl-2-Homologa wie Bax, Bid, Bim und Bad. Als Folge der Aktivierung kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Cytoplasma. Cytochrom c ermöglicht die Aktivierung des Apoptosoms und damit von Procaspase-9. (C) Die aktiven Caspasen-8 und -9 führen zur Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Diese sind verantwortlich für die Spaltung von Enzymen, Inhibitoren und Strukturproteinen und führen so zum charakteristischen apoptotischen Phänotyp. Darüber hinaus bewirken sie die Exposition von Phosphatidylserin und anderen Zelloberflächenmarkern, die die Erkennung und Phagozytose der apoptotischen Zelle durch Nachbarzellen oder Makrophagen gewährleisten.

Mitochondrien. Die proapoptotischen Mitglieder können in zwei Untergruppen unterteilt werden: die Bax-Familie, zu der Bax und Bad gehören, welche über die Bcl-2-Homologiedomänen BH1, BH2 und BH3 verfügen, und die Familie der BH3-*only*-Proteine, die lediglich eine BH3-Domäne besitzen (Martinou und Green, 2001; Strasser et al., 2000). Die verschiedenen Familienmitglieder bilden vermutlich Homo- und Heterodimere, die je nach Zusammensetzung pro- oder antiapoptotisch wirken: z.B. antiapoptotische Bcl-2/Bcl-2-Homo- und Bcl-2/Bax-Heterodimere sowie proapoptotische Bax/Bax-Homodimere. Bestimmte proapoptotische Signale beeinflussen nach diesem Modell die Verfügbarkeit und Aktivität der einzelnen Familienmitglieder – und damit die Zusammensetzung der Dimere – und aktivieren so das mitochondriale Zelltodprogramm (Gross et al., 1998; Oltvai et al., 1993; Puthalakath et al., 1999; Sedlak et al., 1995).

Dabei sind, wie in Abbildung 1.4 beschrieben, Bax und Bak die direkten Aktivatoren der Mitochondrien. Sie werden durch Mitglieder der BH3-*only*-Familie aktiviert, indem beispielsweise die durch Spaltung durch Caspase-8 oder -10 trunkierte Form von Bid (tBid) eine Konformationsänderung der cytosolischen Form von Bax induziert. Dadurch wird Bax aus den inhibitorischen Komplexen mit Bcl-2 freigesetzt, homooligomerisiert und lagert sich in die äußere mitochondriale Membran ein, wo es vermutlich Kanäle bildet. Diese sind möglicherweise direkt verantwortlich für die Freisetzung der proapoptotischen Komponenten aus dem Intermembranraum, die für die Aktivierung von Caspasen essentiell ist; möglicherweise vermitteln sie aber auch nur die Aktivierung der sogenannten PT(*perme-*

ability transition, „Permeabilitätsübergangs“-Poren. Interaktionen von Bax mit VDAC oder Ant, die Komponenten der PT-Poren sind, wurden bereits mit verschiedenen Methoden demonstriert (Antonsson und Martinou, 2000; Desagher et al., 1999; Eskes et al., 2000; Martinou und Green, 2001; Wei et al., 2001; Zamzami und Kroemer, 2001).

Außer durch Bid kann die Aktivierung von Bax auch durch weitere Moleküle gesteuert werden: zum Beispiel durch die Aktivierung von Bad, das eine wichtige Rolle bei der Apoptoseregulation bei Wachstumsfaktorentzug spielt. Wachstumsfaktoren wie Interleukin-3 induzieren – vermittelt durch Kinasen wie Akt oder die mitochondriale Proteinkinase A – die Phosphorylierung des proapoptotischen Bcl-2-Homologs Bad. Phosphoryliertes Bad bindet an das Protein 14-3-3 und wird auf diese Weise inaktiviert. Liegt Bad jedoch, ausgelöst durch Wachstumsfaktorentzug, in freier Form vor, induziert es Apoptose über den mitochondrialen Weg. Dieser Mechanismus ermöglicht es der Zelle bei Verschlechterung der Wachstumsfaktorsituation, Apoptose zu induzieren (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997; Harada et al., 1999; Zha et al., 1996). Das freigesetzte Bad assoziiert mit Bcl-x_L und neutralisiert dessen antiapoptotische Wirkung, so dass auch hier die Aktivierung der Mitochondrien durch Freisetzung von Bax vermittelt wird (Gross et al., 1998; Martinou und Green, 2001). Abhängig vom Ca²⁺-Status der Zelle kann Bad auch durch die Ca²⁺-aktivierte Proteinphosphatase Calcineurin dephosphoryliert und damit von 14-3-3 freigesetzt werden (Wang et al., 1999).

Auch die Freisetzung der proapoptotischen Bcl-2-Homologa Bim und Bmf, welche über Dynein am Cytoskelett verankert sind, führt, wie in Abbildung 1.4 dargestellt, zur Aktivierung von Mitochondrien. Verantwortlich für die Freisetzung sind spezifische proapoptotische Signale: beispielsweise im Fall von Bmf der Verlust der Substratadhäsion. Bmf übernimmt daher eine wichtige Rolle bei der Adhäsionsverlust-induzierten Apoptose (Anoikis), die bekanntermaßen über den mitochondrialen Weg erfolgt (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001).

Darüber hinaus kann der mitochondriale Weg der Apoptoseinduktion auch durch reaktive Sauerstoffintermediate, die direkt die PT-Poren aktivieren, aktiviert werden (Cassarino und Bennett, 1999; Kroemer et al., 1997). Auch zahlreiche Chemikalien, UV- und γ -Strahlung aktivieren diesen Weg, z.B. durch Bildung proapoptotisch wirkender reaktiver Sauerstoffintermediate oder indirekt durch Aktivierung des Tumorsuppressors p53. Dieser wird beispielsweise durch DNA-Schädigung aktiviert und veranlasst entweder einen Proliferationsstopp, und damit einhergehend die Reparatur der entstandenen Schäden, oder

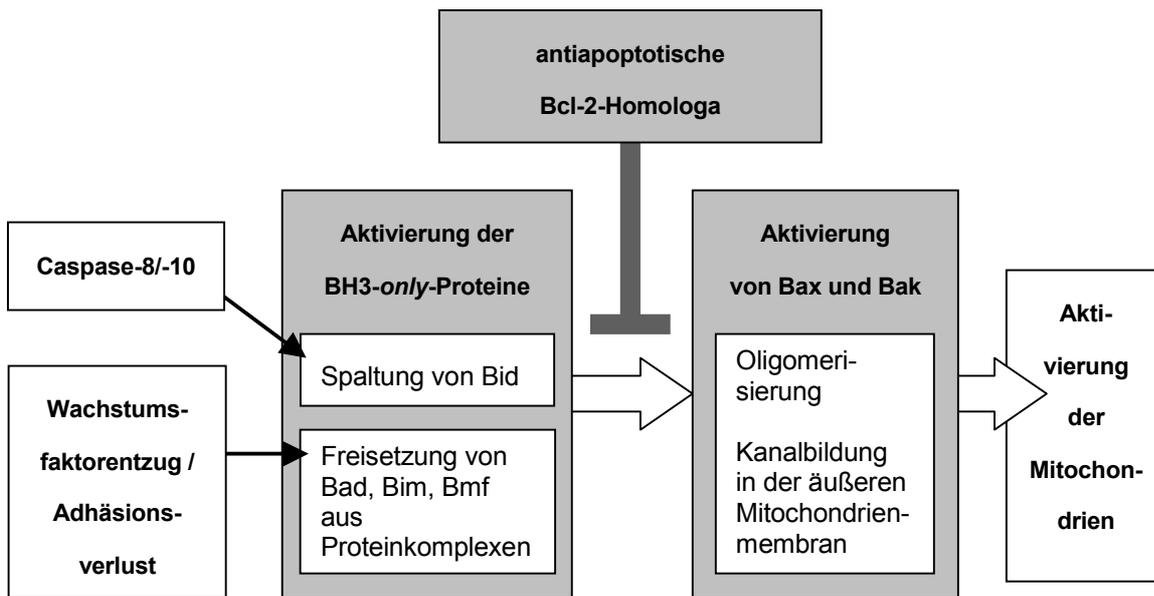


Abbildung 1.4 Modell zur Wirkungsweise der Bcl-2-Homologa (modifiziert nach Martinou und Green, 2001)

BH3-*only*-Proteine werden durch Caspase-8 oder -10 oder durch Wachstumsfaktor- bzw. Adhäsionsverlust aktiviert. Dadurch heben sie die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 und/oder Bcl-x_L auf und aktivieren Bax und/oder Bak. Diese oligomerisieren und bilden vermutlich einen Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran. Dadurch wird die mitochondriale Signalkaskade entweder direkt, oder indirekt durch Aktivierung der PT-Pore, aktiviert.

es induziert Apoptose über den mitochondrialen Weg. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (Carson und Lois, 1995; Lane, 1992).

Auch Effektor-Caspasen können Mitochondrien für die Apoptoseinduktion aktivieren: Beispielsweise aktiviert das von cytotoxischen T-Lymphocyten ausgeschüttete Granzym B, nachdem es in die Zielzelle gelangt ist, u.a. Caspase-3, welche über einen noch unbekanntem Mechanismus die Aktivierung der Mitochondrien bedingt (Kagi et al., 1994b).

Im Verlauf der Aktivierung von Mitochondrien kommt es, wie in Abbildung 1.5 beschrieben, u.a. zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Cytoplasma, wo diese ihre Wirkung entfalten. Diese Freisetzung erfolgt entweder direkt über Kanäle, die von aktivierten Bax- oder Bak-Oligomeren gebildet werden, oder indirekt durch die Bax- oder Bak-induzierte Öffnung der PT-Poren, die beide mitochondrialen Membranen durchziehen. Infolge der PT-Porenöffnung kommt es zu einem Ionenstrom zwischen Cytoplasma und mitochondrialer Matrix und damit zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$. Die Folge ist ein osmotischer Wasser-

einstrom, der zum Anschwellen und Platzen der Organellen führt, wodurch die Faktoren freigesetzt werden. Von besonderer Bedeutung sind dabei Cytochrom c, der Apoptose induzierende Faktor AIF, Smac/DIABLO, welches antiapoptotische cytoplasmatische Proteine (IAPs) inhibiert, die Procaspasen-2, -3 und -9 sowie Ca^{2+} -Ionen, die die Aktivierung von Caspasen und Nukleasen begünstigen (Cassarino und Bennett, 1999; Green und Reed, 1998; Kroemer et al., 1995; Loeffler und Kroemer, 2000; Petit et al., 1997).

Durch den Verlust an Cytochrom c ist die Funktion der mitochondrialen Elektronentransportkette zwischen Komplex III und IV gestört. Es werden vermehrt Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, so dass reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) entstehen, insbesondere Superoxidanionen, die weitere Schäden wie die Oxidation von Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren hervorrufen können (Cai und Jones, 1998; Cassarino und Bennett, 1999; Kroemer et al., 1995; Zamzami et al., 1995).

Wichtiger noch ist Fähigkeit von Cytochrom c, nun, da es in das Cytoplasma gelangt ist, zusammen mit dATP und/oder ATP die Oligomerisierung und Aktivierung der Procaspase-9 zu bewirken. Dadurch entsteht ein funktionelles „Apoptosom“, indem der Komplex aus Procaspase-9 und dem Adaptormolekül Apaf-1 – vermittelt durch das ebenfalls freigesetzte Smac/DIABLO – von dem inhibitorischen XIAP befreit wird (Adams und Cory, 1998; Chinnaiyan, 1999; Li et al., 2001a; Liu et al., 1996; Srinivasula et al., 1998; Srinivasula et al., 2001). Durch die dadurch induzierte räumliche Annäherung bewirkt die geringe Basalaktivität der Procaspase-9-Moleküle deren gegenseitige Aktivierung: Es entsteht aktive Caspase-9, die weitere Caspasen aktiviert und auf diese Weise die proapoptotische Kaskade vorantreibt (Slee et al., 1999).

Auch die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors AIF trägt zur Apoptose bei. AIF ist ein Protein, das in den Kern transloziert und dem unabhängig von Caspasen eine zentrale Rolle bei der gezielten Degradierung zellulärer Komponenten zukommt. AIF bewirkt die Kondensation des peripheren Chromatins, die Degradation der DNA in 50 kbp-Fragmente, jedoch nicht in oligonukleosomale Fragmente, und die Exposition von Phosphatidylserin (Green und Reed, 1998; Joza et al., 2001; Loeffler und Kroemer, 2000; Susin et al., 1999).

Der Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Cytoplasma aktiviert Ca^{2+} -abhängige Enzyme wie Gewebetransglutaminasen, die bestimmte zelluläre Proteine quervernetzen und auf diese Weise die unkontrollierte Freisetzung von Zellkomponenten verhindern. Möglicherweise tragen sie auch zur Bildung der apoptotischen Körperchen bei (Fesus et al., 1989; Martin et al., 1994). Auch Endonukleasen werden durch den Anstieg der Ca^{2+} -

Ionenkonzentration aktiviert, der nicht nur durch Freisetzung aus den Mitochondrien, sondern auch durch Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Reticulum und durch Ca^{2+} -Influx aus dem extrazellulären Raum bedingt sein kann (Bellomo et al., 1992). Voraussetzung für die Aktivierung ist jedoch, dass die Nukleasen zusätzlich von ihrem Inhibitor ICAD befreit werden, indem dieser durch Caspasen gespalten wird (siehe auch Abschnitt 1.2.3). Die so aktivierten Nukleasen zerlegen die chromosomale DNA der Zelle durch internukleosomale Spaltung in Fragmente, deren Länge der um Histone gewundenen DNA, also Vielfachen von 180 bp entspricht, und die ein charakteristisches Merkmal der Apoptose sind (Arends et al., 1990; Cohen und Duke, 1984; McConkey et al., 1989).

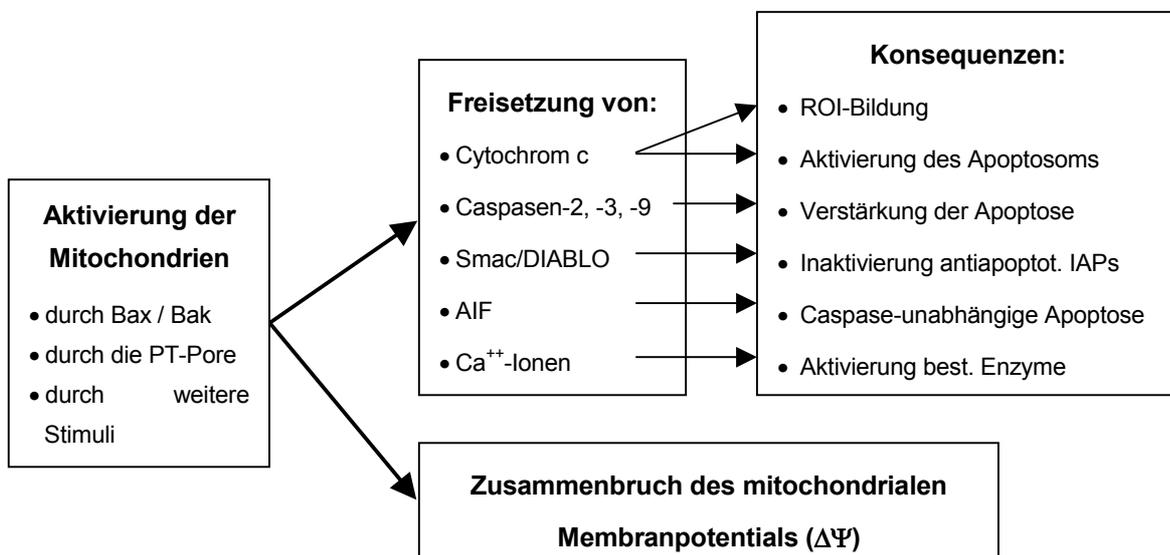


Abbildung 1.5 Überblick über die mitochondrialen Veränderungen im Verlauf der Apoptose

Die Aktivierung von Mitochondrien erfolgt entweder durch von homooligomeren Bax- oder Bak-Molekülen geformte Poren oder durch die Aktivierung der PT-Pore, welche beispielsweise durch reaktive Sauerstoffintermediate ausgelöst wird. Infolge der Aktivierung kommt es zur Freisetzung zahlreicher Faktoren aus dem Intermembranraum, die im Cytoplasma oder Zellkern ihre proapoptotische Wirkung entfalten. Durch den Verlust an Cytochrom c ist die Funktion der Elektronentransportkette gestört: es kommt zur verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI). Zudem bricht das Membranpotential an der inneren Mitochondrienmembran zusammen; der verbliebene Elektronentransport und die ATP-Synthese werden entkoppelt.

1.2.3 Caspasen – zentrale Mediatoren der Apoptose

Sowohl der Rezeptor-vermittelte als auch der mitochondriale Weg der Apoptoseinduktion mündet, wie in Abbildung 1.3 C beschrieben, in der Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Substrate innerhalb einer spezifischen Tetrapeptidsequenz C-terminal von einem Aspartat-Rest schneiden. Die Liste ihrer Substrate umfasst weitere Caspasen, zahlreiche Strukturproteine, Inhibitoren und Enzyme. Sie tragen somit entscheidend zur spezifischen Degradation zellulärer Komponenten während der Apoptose bei (Nicholson und Thornberry, 1997).

Die Familie der Caspasen umfasst allein bei Säugetieren mindestens 14 Homologa (Nicholson und Thornberry, 1997; Strasser et al., 2000). Die Vorläufer von Caspasen, die Procaspasen, sind ubiquitär exprimiert. Diese verfügen jedoch nur über eine geringe basale Enzymaktivität, nämlich etwa 1-2 % der vollen Aktivität (Green, 1998), und bestehen aus einer Prodomäne sowie aus zwei weiteren Bereichen. Ihre Aktivierung erfolgt, wie in Abbildung 1.6 A skizziert, durch zweifache Spaltung, so dass aus einem Vorläufermolekül eine 10 kD und eine 20 kD Untereinheit entsteht. Die aus diesen Untereinheiten zusammengesetzte aktive Caspase ist ein Heterotetramer aus zwei identischen 10 kD und zwei identischen 20 kD Untereinheiten (Rotonda et al., 1996; Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994).

Man unterscheidet zwischen Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen (Thornberry und Lazebnik, 1998): Initiator-Caspasen wie Caspase-2, -8, -9 oder -10 zeichnen sich durch eine verlängerte Prodomäne aus. Durch die Interaktion der Prodomänen mit Adaptermolekülen wie FADD oder Apaf-1 entstehen Homodimere, die sich mit ihrer geringen Basalaktivität gegenseitig aktivieren. Damit sind die Initiator-Caspasen eine wichtige Schaltstelle für die Weiterleitung des proapoptotischen Signals. Ihre Substrate sind die Effektor-Caspasen. Die Effektor-Caspasen (vergleiche Abbildung 1.3 C) werden ausschließlich durch Caspasen aktiviert. Sie spalten zum Teil weitere Caspasen und verstärken so das apoptotische Signal (Slee et al., 1999), vor allem aber sind sie verantwortlich für zahlreiche zelluläre Effekte, die im Verlauf der Apoptose zu beobachten und in Abbildung 1.3 C zusammengefasst sind: Sie spalten Enzyme und Strukturproteine und führen somit auch zur Exposition von Phosphatidylserin und anderen Zelloberflächenmarkern, die die Erkennung und Phagozytose durch Nachbarzellen oder Makrophagen gewährleisten (Fadok et al., 2000; Fadok et al., 2001; Henson et al., 2001). Beispielsweise wird durch Spaltung der Poly-(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase PARP die energieaufwändige Reparatur von DNA-Strangbrüchen verhindert. Der Zusammenbruch der Kernmembran und die

Fragmentierung des Kerns wird durch Spaltung von Laminen und des nukleären Mitose-Apparat-Proteins bedingt (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation ist Folge der Inaktivierung von DNA-Topoisomerase II α und von ICAD (DFF, DNA-Fragmentierungs-Faktor), dem Inhibitor der Caspase-aktivierten Ca²⁺-abhängigen DNase (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997; Sakahira et al., 1998). Die dadurch bedingte und bereits beschriebene internukleosomale Spaltung der DNA gewährleistet die

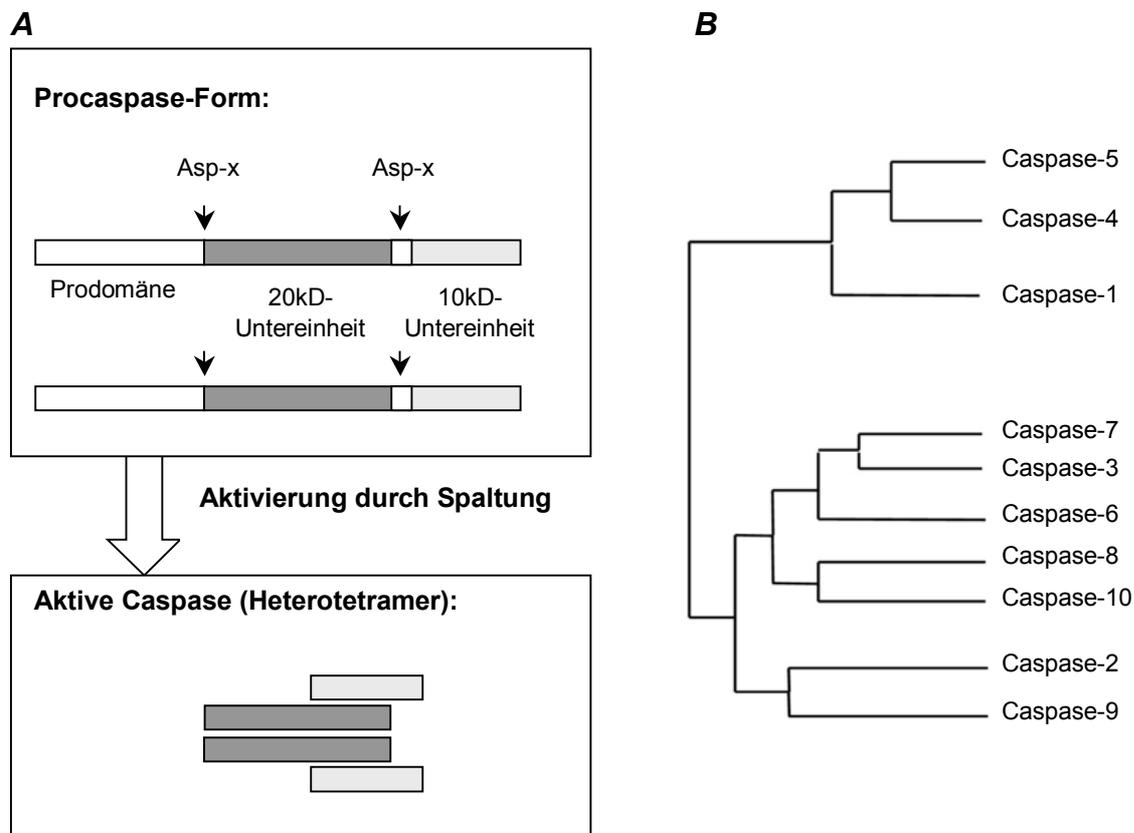


Abbildung 1.6 Die Caspasen: Mechanismus der Aktivierung und phylogenetischer Überblick

(A) Die Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme vor, die eine Prodomäne enthalten. Diese ermöglicht im Fall der Initiator-Caspasen die Anlagerung an Adapterproteine durch Zelltod-Effektor-Domänen (DED) oder Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD). Die Procaspasen werden aktiviert durch gegenseitige intermolekulare Proteolyse oder durch andere Caspasen, die in spezifischen Tetrypeptidsequenzmotiven nach einem Aspartatrest schneiden (Pfeile): es entstehen aktive Heterotetramere, die aus je zwei 10 kD- und zwei 20 kD-Untereinheiten bestehen und über zwei katalytische Zentren verfügen. (B) Die Familie der Caspasen gliedert sich in zwei Unterfamilien: Untergruppen bilden die Initiator-Caspasen-8 und -10, die die Rezeptor-vermittelte Apoptose transduzieren, und die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Nicht alle Caspasen vermitteln Apoptose; Caspase-1 beispielsweise vermittelt Entzündungsreaktionen (modifiziert nach Nicholson und Thornberry, 1997).

Zerstörung des genetischen Informationsgehalts der Zelle und macht damit den Prozess der Apoptose irreversibel. Zudem erleichtert sie die Aufnahme der apoptotischen Zelle durch Phagozyten (Martin et al., 1994).

Weitere Substrate der Effektor-Caspasen sind die an der Cytoskelettbildung beteiligten Proteine Actin, Gelsolin und Fodrin sowie PAK-2, das an der Bildung der apoptotischen Körperchen beteiligt ist (Rudel und Bokoch, 1997; Thornberry und Lazebnik, 1998). Aber auch antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x_L werden durch Caspasen gespalten, was wiederum zu einer Verstärkung der proapoptotischen Signalkaskade führt (Strasser et al., 2000; Thornberry und Lazebnik, 1998).

1.3 Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Apoptose und DNA-Sequenzen für Caspasen findet man bei Cnidariern, Nematoden, Insekten, Fischen und Säugetieren. Sogar bei Pflanzen wurden Komponenten der apoptotischen Maschinerie identifiziert (Aravind et al., 1999; Cikala et al., 1999; Inohara und Nunez, 2000). Diese evolutionäre Konserviertheit der Apoptose ist ein Indiz für die Notwendigkeit des gesteuerten Zelltods für das Entstehen und Überleben von Organismen.

1.3.1 Apoptose im gesunden Organismus

Im Verlauf der Ontogenese dient der programmierte Zelltod der Entfernung überflüssiger oder störender Zellen, die aufgrund morphogenetischer oder phylogenetischer Zwänge gebildet wurden. Er ist somit für die Strukturbildung von essentieller Bedeutung: Beispielsweise wird die Gastrulation des frühen Embryos durch den regulierten Tod von Zellen im Innern der Blastula ermöglicht (Joza et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist die Entstehung des Augenbechers, der Augenlinse oder des Neuralrohrs durch Ablösung vom umliegenden Gewebe. Ebenso werden die freistehenden Finger und Zehen des Menschen, die in der frühen Embryogenese, ähnlich wie bei Vögeln, durch Zwischengewebe („Schwimnhäute“) verbunden sind, durch programmierten Zelltod hervorgebracht (Meier et al., 2000; Milligan und Schwartz, 1997). Auch die Funktion von Gehirn und Immunsystem wird dadurch ermöglicht, dass zunächst sehr viele Zellen gebildet werden, von denen nur einige ausgewählt überleben: So sterben 80 % der Ganglionzellen in der Katzenretina kurz nach der Geburt, da es ihnen nicht gelungen ist, durch ausreichende Vernetzung mit Nachbarzellen ihre eigene Versorgung mit neurotrophen Faktoren zu gewährleisten (Meier et al., 2000). Im Immunsystem ist der programmierte Zelltod für die negative Selektion autoreak-

tiver und unzureichend aktiver B- und T-Zellen sowie für die Entfernung virusbefallener Zellen verantwortlich. Zudem wird gegen Ende der Immunantwort die Zahl antigenreaktiver Lymphocyten, die durch klonale Expansion vermehrt wurde, durch Apoptose wieder auf das normale Maß reduziert (Bouillet et al., 1999; Braun et al., 1996; Kagi et al., 1994a; Kagi et al., 1994b; Krammer, 2000). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der Apoptose ist der Steroidhormon-gesteuerte Ab- und Umbau von Geweben am Ende der Menstruation, Schwangerschaft oder Laktation (Gosden und Spears, 1997).

1.3.2 Fehlregulierte Apoptose bei Erkrankungen

Da die Funktion unseres Körpers und seiner Organe eng an deren Größe, Integrität und Funktionalität gekoppelt ist, führt eine Störung der Gewebemöostase, ein Zuviel oder Zuwenig an Apoptose, in bestimmten Fällen zu Komplikationen. Dabei kann sich – je nach Kontext – sowohl ein Übermaß als auch ein Mangel als nachteilig erweisen.

Ein Übermaß an Apoptose wurde beispielsweise in Zusammenhang mit neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson beobachtet. Auch bei AIDS und Infarkten kann Apoptose zum Krankheitsbild beitragen. Sind durch Apoptose wesentliche Komponenten des Immunsystems geschwächt, kann es zu vermehrten Infektionen, beispielsweise mit Herpes- oder Adenoviren, kommen (McLaughlin et al., 2001; Thompson, 1995).

Zuwenig Apoptose kann dagegen zum Beispiel zu einer verstärkten humoralen Immunantwort und Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythematosus führen, da autoreaktive Lymphocyten nicht ausreichend eliminiert werden (Bouillet et al., 1999; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Auch Krebs ist eine mögliche Folge reduzierter Apoptose. Häufig werden Tumorzellen durch Apoptose dem Organismus entzogen, so dass es gar nicht erst zur Manifestation von Tumoren kommt. Ist die Apoptoserate in einem Gewebe jedoch erniedrigt, beispielsweise durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 oder durch Überexpression des Apoptoseinhibitors Bcl-2, steigt die Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung. Vermutlich ist dies durch die Verlängerung der Lebensspanne der Zellen bedingt, die zudem den Erwerb weiterer onkogener Mutationen wahrscheinlicher macht (Strasser et al., 2000).

1.4 Tumorbildung und Metastasierung

Die Tumor- und Metastasenbildung ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der im Folgenden vorgestellt wird und in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt ist. Grundvoraus-

setzung ist dabei, dass das Maß an Zellteilung das an Zelltod übersteigt. Dies bedeutet, dass die üblichen Regulationsmechanismen, die die übermäßige Vermehrung von Zellen verhindern, außer Kraft gesetzt sind, die Zellproliferation dereguliert und die Apoptose supprimiert ist (Evan und Vousden, 2001).

1.4.1 Apoptose bei der Tumor- und Metastasenbildung

Die onkogene Transformation einer Zelle erfordert zumeist vier bis sieben zentrale, sich in ihrer Wirkung ergänzende, und pleiotrope Effekte erzielende Mutationen. Diese führen zur verstärkten Expression von Onkogenen, die z.B. wie c-myc oder E2F die Zellteilung propagieren oder wie Bcl-2 Apoptose verhindern. Neben der Aktivierung von Onkogenen ist die verminderte Expression von Tumorsuppressorgenen, also von Genen wie beispielsweise ARF, RB und p53, die die Zellzyklusregulation, Proliferation und Apoptose kontrollieren, von zentraler Bedeutung. Weitere transformierende Veränderungen sind die autokrine Produktion von Mitogenen, die normalerweise das Zellwachstum limitieren, oder aktivierende Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen oder signalübertragenden Proteinen wie Ras. Viele dieser Veränderungen verstärken nicht nur die Proliferation, sondern verhindern gleichzeitig die Differenzierung der Zellen, so dass diese sich prinzipiell unbegrenzt vermehren und zu einem Primärtumor heranwachsen können (Evan und Vousden, 2001; Hanahan und Weinberg, 2000; Meier et al., 2000).

Mit zunehmender Größe des Primärtumors verschlechtert sich die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Eine Versorgung mit Blutgefäßen (Vaskularisierung, Angiogenese) wird erforderlich, da bereits bei einem Abstand von etwa 100 µm zur nächsten Kapillare hypoxische Verhältnisse und Wachstumsfaktormangel das weitere Tumorwachstum durch Apoptoseinduktion limitieren (Dang und Semenza, 1999; Hanahan und Weinberg, 2000). Die neugebildeten Blutgefäße ermöglichen dem Primärtumor nicht nur das weitere Wachstum, sondern auch seine Ausbreitung in andere Organe.

Voraussetzung für die Metastasierung ist die Ablösung (Dissoziation) von Zellen vom Primärtumor und ihr Eindringen in die Blut- oder auch Lymphgefäße (Intravasation). Die Ablösung wird durch die verminderte Expression von Zelloberflächenmolekülen wie E-Cadherin und bestimmten Integrinen ermöglicht, die damit als Vermittler von Überlebenssignalen wegfallen. Die durch die Ablösung bedingten Veränderungen des Cytoskeletts aktivieren, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, das proapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bmf und damit den mitochondrialen Apoptoseweg (Evan und Vousden, 2001; Li et al., 2001b; Puthalakath et al., 2001). Metastasierende Tumorzellen können die

durch die Ablösung induzierte Apoptose, die auch als Anoikis bezeichnet wird, durch Veränderungen im Expressionsmuster bestimmter Integrine sowie durch Überexpression antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder vermeiden (Frisch und Ruoslahti, 1997; Hanahan und Weinberg, 2000; Matter und Ruoslahti, 2001).

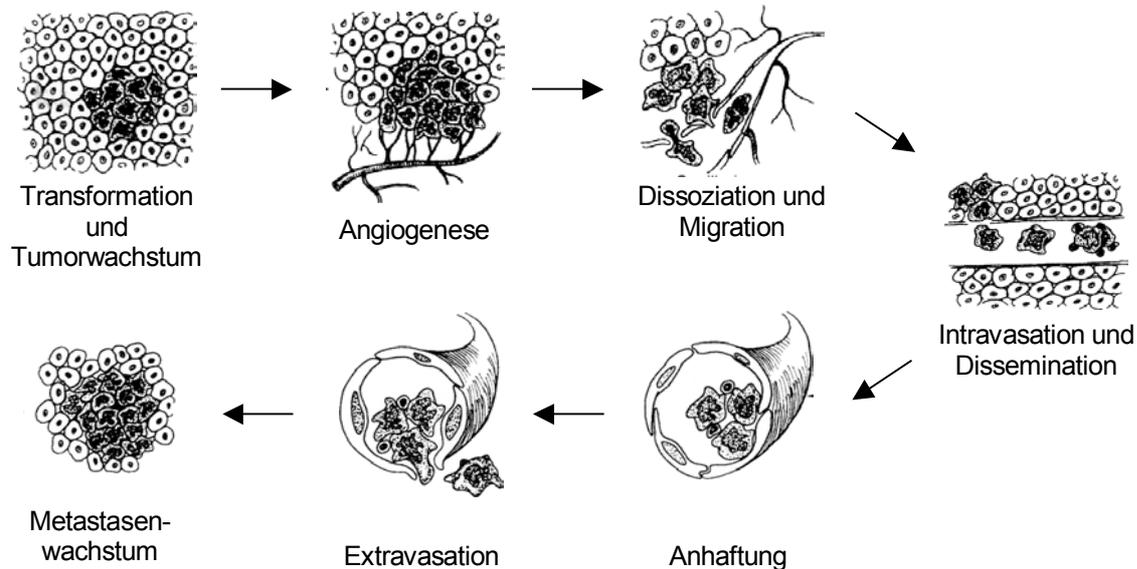


Abbildung 1.7 Allgemeines Modell zur Progression von Tumoren und Entwicklung von Metastasen

Schematisch dargestellt ist die Entstehung des Primärtumors durch Transformation einer Zelle, dessen Angiogenese, die Ablösung, Migration und Intravasation einzelner Tumorzellen, deren Verbreitung innerhalb des Körpers, die Anhaftung und Extravasation der Zellen und schließlich das Wachstum des Sekundärtumors (nach Gnirke, 2000).

Um in die Blutgefäße eindringen zu können, müssen Tumorzellen nicht nur beweglich sein, sondern auch die Barriere der Basalmembran überwinden. Dies erfolgt durch Bildung und/oder Aktivierung von Proteasen wie Cathepsinen, Serinproteinasen (z.B. Urokinase-Typ- oder Gewebetyp-Plasminogen-Aktivatoren) und Matrixmetalloproteinasen, die die extrazelluläre Matrix auflösen (Moustafa und Nicolson, 1997).

Die im Blut- oder Lymphsystem angekommenen Zellen verbreiten sich im Körper (Dissemination), jedoch überleben nur 0,1 % von ihnen (Yoshida et al., 2000). Gelingt es einer Zelle, an Kapillarwände zu adhären, kann entweder direkt im Blutgefäß, wie im Fall bestimmter Lungenmetastasen (Al-Mehdi et al., 2000), oder aber nach erfolgreicher Extra-

vasion und Einwanderung in das umliegende Gewebe eine Metastase entstehen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Das Auftreten von einzelnen Tumorzellen in einem anderen Gewebe, die auch als Mikrometastasen bezeichnet werden, ist recht häufig zu beobachten und für den Körper relativ unbedenklich. Erst das Heranwachsen der Mikrometastasen zu über 1 mm großen Metastasen ist klinisch problematisch und führt häufig zum Tod (Yoshida et al., 2000). Jedoch ist das Wachstum der Metastasen ein kritischer Schritt: zum einen muss wiederum die Vaskularisierung gewährleistet werden und zum anderen ist jede Zelle grundsätzlich adaptiert an eine spezifische, in ihrer natürlichen Umgebung gegebene Kombination mitogener Signale, z.B. bestimmte Cytokine, Hormone, Komponenten der Extrazellulären Matrix und Oberflächenmoleküle von Nachbarzellen. Fehlen diese Überlebenssignale, stirbt sie durch Apoptose (Evan und Vousden, 2001; Raff, 1992; Raff et al., 1993). Ein Beispiel hierfür ist das Tumorsuppressorgen und Zelloberflächen-Rezeptormolekül DCC, dessen Expression in 50 % der Kolonkarzinomfälle herabreguliert ist, vermutlich deshalb, weil es in Abwesenheit seines Liganden Apoptose induziert, während es in dessen Gegenwart Apoptose sogar inhibiert (Forcet et al., 2001). Ebenso verhindert beispielsweise die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch seinen Liganden Apoptose im natürlichen Umfeld der Zelle, und zwar durch Stimulation der Transkription des antiapoptotischen Proteins Bcl-x_L (Jost et al., 1999).

Dies bedeutet, dass eine Zelle, die an einem anderen Ort innerhalb des Körpers zu einer Metastase heranzuwächst, sowohl eine gewisse Unabhängigkeit von gewissen extrazellulären Proliferationsstimuli als auch eine Resistenz gegenüber bestimmten Apoptose-induzierenden Signalen erlangt haben muss (Evan und Littlewood, 1998; Hanahan und Weinberg, 2000).

1.4.2 Tumor- und Metastasensuppressoren

Bei der Tumorbildung und Metastasierung müssen die Zellen, wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, den verschiedensten Apoptosestimuli entgehen. Daher ist in vielen Tumoren die Expression wichtiger Apoptose-induzierender Tumorsuppressorgene herabreguliert: Das bekannteste ist p53, das in mehr als 50 % aller Tumore mutiert oder herabreguliert ist (Levine, 1997). Weitere Beispiele sind das bereits erwähnte DCC (Forcet et al., 2001), aber auch das im Apoptosom enthaltene Apaf-1 (Soengas et al., 2001). Darüber hinaus erzielt die Aktivierung vieler Onkogene und die Deaktivierung bestimmter Tumorsuppressorgene pleiotrope Wirkungen, da einzelne Gene wie p53, ARF und myc nicht nur auf den

Zellzyklus, sondern auch auf die Differenzierung, die Apoptose, die Vaskularisierung und die Expression von Zelloberflächenmolekülen Einfluss nehmen. Daher ermöglicht eine begrenzte Zahl von Veränderungen einen so komplexen Prozess wie die Tumorbildung und Metastasierung (Evan und Vousden, 2001).

Während über die Wirkung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen einiges bekannt ist, gibt es nur wenige Kenntnisse von der Wirkweise der Metastasensuppressorgene. Diese verhindern zwar nicht die Tumorbildung, dafür aber die Ausbreitung von Tumorzellen bzw. das Heranwachsen zu klinisch relevanten makroskopischen Metastasen. Mit Hilfe subtraktiver cDNA-Verfahren oder durch Mikrozell-medierten Chromosomentransfer und anschließendem *in vivo* Test der Tumorigenität wurden Nm23, CD82/KAI1, KiSS-1, MKK4 und BRMS1 als Metastasensuppressorgene identifiziert (Yoshida et al., 2000). Sie werden im Folgenden vorgestellt: Am bekanntesten und besten charakterisiert sind CD82/KAI1 (vergleiche Abschnitt 1.5) und Nm23. Nm23 ist eine Nukleosiddiphosphat-Kinase und reguliert, vermittelt durch den Rac1-spezifischen Nukleotidaustausch-Faktor Tiam1, die Rac1 GTPase. Auf diese Weise könnte Nm23 die Aktivierung des Onkogens c-jun verhindern (Otsuki et al., 2001). Außerdem vermindert Nm23 durch Herabregulation der N-Acetylglucosamintransferase V die für die Metastasierung wichtige Zellmigration (Guo et al., 2000). Auch KiSS1, ein Ligand eines bislang uncharakterisierten G-Protein gekoppelten Rezeptors, inhibiert die Zellmotilität und ist in 44 % der Metastasen von Melanomen herabreguliert (Ohtaki et al., 2001; Shirasaki et al., 2001). Über die Wirkungsweise der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase MKK4, die in 31 % der Prostatakrebsmetastasen vermindert exprimiert wird, und des Brustkrebs-Metastasensuppressors 1 (BRMS1) ist derzeit noch nichts bekannt (Kim et al., 2001b; Seraj et al., 2000). Auch CC3, CD44 und Maspin sowie die Kinasen Syk und DAP-Kinase spielen möglicherweise eine Rolle als Metastasensuppressoren. Allerdings supprimieren wenigstens einige von ihnen – im Gegensatz zu den zuvor angeführten Genen – auch das Wachstum des Primärtumors (Kim et al., 2001a; Stewart und Pietenpol, 2001; Xiao et al., 2000; Yoshida et al., 2000).

Alle diese Metastasensuppressoren sind für den Verlauf einer Krebserkrankung und damit als prognostische Marker sehr wichtig, da die Letalität bei Krebserkrankungen in 90 % der Fälle nicht durch den Primärtumor, sondern durch die entstandenen Metastasen bedingt ist (Sporn, 1996; Yoshida et al., 2000). Wie sie auf molekularer Ebene ihre Wirkung entfalten, ist daher von besonderem Interesse.

1.5 Der Metastasensuppressor CD82/KAI1/C33

Der Metastasensuppressor CD82/KAI1/C33 wurde im Rahmen dieser Arbeit als Apoptose-induzierendes Protein isoliert und charakterisiert. Daher soll er an dieser Stelle genauer vorgestellt werden.

CD82/KAI1 ist ein 29,6 kDa großes Zelloberflächenprotein mit 267 Aminosäuren, das der Familie der Tetraspanine angehört, die 26 Mitglieder umfaßt. Diese ist charakterisiert durch vier in der Cytoplasmamembran lokalisierte Transmembrandomänen, eine kleine und eine größere extrazelluläre Schleife, sowie durch kurze N- und C-terminale intrazelluläre Domänen. Im Fall von CD82 umfassen diese lediglich 9 bzw. 13 Aminosäuren. Die große extrazelluläre Schleife von CD82 wird durch Disulfidbrücken stabilisiert und ist je nach Zelltyp unterschiedlich stark glykosyliert, so dass das Molekulargewicht bis zu 80 kDa erreichen kann (Boucheix und Rubinstein, 2001; Cannon und Cresswell, 2001; Dong et al., 1995). CD82/KAI1 ist identisch mit IA4 und R2 (Gil et al., 1992; Imai et al., 1992).

1.5.1 Die Wirkung von CD82/KAI1 als Metastasensuppressor

Die metastasierungssupprimierende Eigenschaft von KAI1, dessen Name vom chinesischen *kang ai* („anti Krebs“) abgeleitet wurde, wurde 1995 von Dong et al. entdeckt: Sie demonstrierten, dass das Einbringen des auf Chromosom 11p11.2 lokalisierten Gens CD82/KAI1 in Ratten-AT1-Prostatakrebszellen zwar nicht die primäre Tumorbildung, dafür aber die Ausbildung von Metastasen in Nacktmäusen unterdrückt (Dong et al., 1995). Auch für Melanome und Brustkrebs wurde die metastasierungssupprimierende Fähigkeit von CD82 *in vivo* nachgewiesen, wobei die Expression von CD82 die Häufigkeit von Brustkrebs-Metastasen in Nacktmäusen um wenigstens 50 % reduzierte (Takaoka et al., 1998; Yang et al., 2001). Allerdings kann CD82, ebenso wie andere Metastasensuppressorgene, z.B. KiSS-1 (Lee und Welch, 1997), die Metastasierung vieler Tumorzellen zwar signifikant, aber nicht vollständig, unterdrücken, da die Metastasierung ein durch mehrere unabhängige Veränderungen bedingter Prozess ist, bei dem jedoch CD82 eine entscheidende Rolle spielt (Yang et al., 2001).

Auch beim Menschen ist die Verminderung der CD82-Expression von Bedeutung. Dies kommt darin zum Ausdruck, dass gerade in aggressiven hochmetastasierenden Primärtumoren sowie in Metastasen verschiedenster Tumorarten die Expression von CD82 herabreguliert ist: z.B. bei Prostatakrebs, Brustkrebs, Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Pankreaskrebs, Blasenkrebs, Magenkrebs und Speiseröhrenkrebs (Adachi et al., 1996; Dong

et al., 1996; Guo et al., 1996; Higashiyama et al., 1998; Hinoda et al., 1998; Huang et al., 1998; Uchida et al., 1999; Yu et al., 1997). Daher wird bei diesen Krebsarten die CD82-Expression auch als molekularer Marker für die Prognose des Metastasierungspotentials eines Tumors angesehen. Im Vergleich zu anderen Metastasensuppressorgenen spielt CD82 dabei eine besonders zentrale Rolle und könnte daher für die Entwicklung von Therapien von besonderer Bedeutung sein.

1.5.2 Die Regulation der CD82/KAI1-Expression

Wie beschrieben, ist die Expression von CD82 in zahlreichen Tumoren erniedrigt, und zwar sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene. Dies ist nicht die Folge von Deletionen (Verlust der Heterozygotie), Mutationen oder Hypermethylierung, sondern vermutlich bedingt durch fehlende transkriptionelle Aktivierung (Dong et al., 1996; Jackson et al., 2000; Miyazaki et al., 2000; Tagawa et al., 1999). Die Transkription von CD82 kann prinzipiell durch verschiedene Faktoren aktiviert werden: In der Promotorregion von CD82 finden sich beispielsweise Bindemotive für den Tumorsuppressor und Apoptoseinduzierer p53 (Mashimo et al., 2000; Mashimo et al., 1998) und den unter hypoxischen Bedingungen aktiven Transkriptionsfaktor NF-IL-6 (Dong et al., 1997; Yan et al., 1997). Außerdem kann die CD82-Expression durch den Nervenwachstumsfaktor NGF (auch in Nicht-Neuronen) und durch NF κ B aktiviert werden. Da NGF und NF κ B ebenso wie p53 in einigen Tumoren nicht mehr vorhanden bzw. inaktiviert sind, könnte der Mangel dieser Faktoren möglicherweise zu der beobachteten Herabregulation von CD82 beitragen (Li et al., 2001a; Shinohara et al., 2001a; Sigala et al., 1999).

1.5.3 Die zellbiologische Bedeutung von CD82/KAI1

Welche molekularen Vorgänge für die metastasierungssupprimierende Eigenschaft von CD82 verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt, da die von CD82 bewirkten Effekte vielfältig und erst in Ansätzen verstanden sind.

Zum einen interagiert CD82 über seine große extrazelluläre Domäne mit verschiedenen Integrinen, z.B. mit α 3 β 1-, α 6 β 1-, und α 4 β 1-Integrinen (Boucheix und Rubinstein, 2001; Mannion et al., 1996; Ono et al., 2000; Zhang et al., 2001) oder dem Integrin LFA-1, welches durch CD82 in die Adhäsionsfoci der Zellen rekrutiert wird (Shibagaki et al., 1998; Shibagaki et al., 1999). Auf diese Weise, möglicherweise aber auch durch seine Interaktion mit E-Cadherin, welches Zell-Zell-Kontakte vermittelt (Afshari et al., 1999), verstärkt CD82 die Adhärenz der Zellen und vermindert deren Motilität, was von entscheidender Bedeutung

für seine Wirkung als Metastasensuppressor sein könnte (Ono et al., 1999; Ono et al., 2000). CD82, das Teil des multimolekularen Tetraspaninnetzwerks in der Cytoplasmamembran ist, interagiert nicht nur mit verschiedenen Integrinen, sondern reguliert auch deren Aktivierung: Wie einige der Tetraspanine, mit denen CD82 direkt oder indirekt interagiert (z.B. CD9, CD53, CD81 und CD151 (Hammond et al., 1998)), interagiert auch CD82 mit Proteinkinasen wie PKC α . Diese Interaktion erfolgt durch den N-terminalen cytoplasmatischen Teil oder die ersten beiden Transmembrandomänen der Tetraspanine und hat zur Folge, dass etwa 15-25 % der zellulären PKC an die Tetraspanine gebunden werden. Die damit einhergehende räumliche Annäherung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der ebenfalls an die Tetraspanine assoziierten α 3- und α 6-Integrine (Zhang et al., 2001). Zudem regulieren die Tetraspanine CD82, CD9, CD63, CD81 und CD151, wie Versuche mit anti-Tetraspanin-Antikörpern zeigen, die Phosphorylierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) sowie eventuell auch anderer (Tyrosin-) Kinasen (Lebel-Binay et al., 1995). Die FAK ist an der Reorganisation des corticalen Actin-Cytoskeletts beteiligt, steht mit Integrinen in Verbindung und beeinflusst die Migration der Zellen (Berditchevski und Odintsova, 1999; Boucheix und Rubinstein, 2001).

Ebenfalls für die Metastasierung relevant könnte die Interaktion von CD82 mit dem Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-Rezeptor) sein. CD82 beschleunigt dessen Internalisierung, wodurch der Zelle proliferations- und migrationsinduzierende Signale vorenthalten werden. Auch aufgrund dieser Eigenschaft könnte sich die Reduktion der CD82-Expression für das Metastasierungspotential der Zelle positiv auswirken und einen ähnlichen Effekt wie die in vielen Tumoren beobachtete Hochregulation des EGF-Rezeptors bewirken. Zudem könnte auch hier die oben beschriebene Funktion von CD82 im Tetraspaninnetzwerk von Bedeutung sein, da CD82 die EGF-induzierte Actin-Polymerisierung im Zellkortex, die Bildung von Lamellipodien und die Zellmigration unterdrückt (Moustafa und Nicolson, 1997; Odintsova et al., 2000). Möglicherweise ist CD82 auch an der Endocytose weiterer Rezeptormoleküle beteiligt, zumal es auch zur Endocytose von CD4, einem Corezeptor des T-Zellrezeptors, beiträgt (Imai et al., 1995). Außerdem verfügt es im C-terminalen cytosolischen Teil über ein YSKV-Bindemotiv für das Clathrin-aktivierende Protein 2, welches als Internalisierungssignal dienen könnte (Boll et al., 1996; Hammond et al., 1998).

Die Entdeckung weiterer Funktionen von CD82 ist zu erwarten, zumal außer dem bislang uncharakterisierten Schwangerschafts-spezifischen Glykoprotein 17, welches das Tetra-

spanin CD9 bindet (Waterhouse et al., 2002), bislang kein natürlicher Ligand eines Tetraspanins identifiziert wurde.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Da erst ein Bruchteil der Proteine bekannt sein dürfte, die unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen an der Apoptoseinduktion beteiligt sind, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue Komponenten von Apoptosewegen zu finden. Hierzu sollte das von Grimm und Leder entwickelte Expressions-Reihenuntersuchungsverfahren verwendet werden, das auf der Transfektion einer Maus-cDNA-Bibliothek in humane Nierenzellen (293T) und anschließender phänotypischer Analyse apoptotischer Veränderungen beruht. Dieses halbautomatisierte Verfahren erlaubt die vergleichsweise rasche Analyse vieler cDNAs und nutzt aus, dass viele Proteine bekannter Apoptosewege, z.B. Caspase-2 oder Bax, in der Lage sind, bei Überexpression dominant Apoptose zu induzieren (Grimm und Leder, 1997).

Aus den erhaltenen positiven, bislang nicht als proapoptotisch beschriebenen Klonen wurde der Metastasensuppressor C33 – das Maus-Homolog von CD82/KAI1 – für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Dabei sollte der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch C33 näher charakterisiert werden: Einerseits, um möglicherweise Hinweise auf einen neuen Weg der Apoptoseinduktion zu erhalten, und andererseits, um einzuschätzen, ob die proapoptotische Eigenschaft von CD82 zur *in vivo* beobachteten Suppression der Metastasierung, die bislang auf die durch CD82 bewirkte Migrationsinhibition und/oder beschleunigte Internalisierung des EGF-Rezeptors zurückgeführt wurde, beitragen könnte.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid-Lösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biomol, Hamburg
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, München
Aktivkohle Norvid A	Sigma, München
Arsentrioxid	Sigma, München
Bacto Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto Trypton	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)- dimethyl-ammonium]-1 propansulfonat)	Roche, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	BioTech, St. Leon-Rot
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Ethylendioxy-bis-(ethylenitril)-tetraacetat (EGTA)	Biomol, Hamburg
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Glycerin	Merck, Darmstadt

2 Materialien

Glycylglycin	Sigma, München
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure)	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Milupa, Friedrichsdorf
MOPS (3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure)	Biomol, Hamburg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
Nonidet P-40	Sigma, München
Phenol	Sigma, München
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, München
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, München
Saccharose (Sucrose)	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Sigma, München
Siliziumdioxid (Silika)	Sigma, München
TEMED	Sigma, München

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, München
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Sigma, München
Trypton	Difco, Detroit, USA
Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)	Sigma, München
Uridin	Sigma, München
Wasserstoffperoxid (33 %)	Sigma, München

2.2 Molekularbiologische Reagenzien

2.2.1 Antibiotika und biochemische Reagenzien

AACOCF3	Calbiochem, La Jolla, USA
Ampicillin	Sigma, München
Actinomycin D	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
ATP	Sigma, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, München
BAPTA/AM	Calbiochem, La Jolla, USA
Calphostin	Calbiochem, La Jolla, USA
CCCP (Carbonyl-cyanid-m-chlorphenylhydrazon)	Sigma, München
Chelerythrin	Sigma, München
CPRG (Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid)	Roche, Mannheim
Cycloheximid	Sigma, München
DiOC ₆ (3) (3,3'-Dihexyloxacarbocyanin)	Molecular Probes, Leiden, NL
dNTP-Set	Amersham Pharmacia, Freiburg
EGTA/AM	Calbiochem, La Jolla, USA
Etoposid	Sigma, München
Fibronektin (human)	BD Biosciences, Bedford, USA
G418-Sulfat (Geneticin)	Calbiochem, La Jolla, USA
Hydroethidin (HE)	Molecular Probes, Leiden, NL
Interferon-gamma (IFN γ ; human, rekombinant)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma, München
Kristallviolett	Sigma, München

Laminin (human)	Sigma, München
Luciferin	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
MAPTAM	Calbiochem, La Jolla, USA
Penicillin	Sigma, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem, La Jolla, USA
Puromycin	Sigma, München
Streptomycin	Sigma, München
Tetracyclin	Sigma, München
Tiron (4,5-Dihydroxy-1,3-benzol-disulfonsäure)	Sigma, München
TriPure Isolation Reagent	Roche, Mannheim
Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α ; human, rekombinant)	Biomol, Hamburg
Z-VAD-FMK (Z-Val-Ala-Asp (oMe)- Fluormethylketon)	Enzyme Systems Products, Livermore, USA

2.2.2 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von MBI-Fermentas, St. Leon-Rot. Es handelte sich um: Bam HI, Eco RI, Hind III, Not I, Xba I und Xho I.

2.2.3 Andere Enzyme

<i>Expand Long Template</i> PCR-System	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase (<i>Superscript II</i>)	Gibco BRL, Eggenstein
RNase A	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot

2.2.4 Proteinase-Inhibitoren

<i>Complete Mini</i> Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
TLCK (N α -p-Tosyl-L-Lysin-Chlormethyl-Keton)	Sigma, München
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, München

2.2.5 Monoklonale Antikörper

anti-CD82 (azidfrei)	Diaclone, Besançon, Frankreich
anti-CD82 PE	Diaclone, Besançon, Frankreich
anti-Cytochrom c	Pharmingen, San Diego, USA
anti-Fas	Pharmingen, San Diego, USA
anti-HA	Roche, Mannheim
anti-mouse (azidfrei)	Sigma, München
anti-mouse HRP	Amersham Pharmacia, Freiburg
anti-c-myc	Roche, Mannheim
anti-PARP	Roche, Mannheim
anti-rabbit HRP	Amersham Pharmacia, Freiburg
anti-rat HRP	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.2.6 Molekulargewichtsstandards

Als Größenreferenzmarker für DNA-Gele wurde die 100bp- oder die 1kb-DNA-Leiter von Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet. Für Proteingele wurde der *Full-range rainbow recombinant protein molecular weight marker* von Amersham Pharmacia (Freiburg) verwendet.

2.3 Zellkulturmedien

Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)	Sigma, München
Joklik modifiziertes MEM	Gibco BRL, Eggenstein
MEM	Gibco BRL, Eggenstein
RPMI 1640	Gibco BRL, Eggenstein
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma, München

2.4 Oligonukleotide

Alle Oligodesoxyribonukleotide wurden bei der Firma Metabion in Martinsried oder am MPI für Biochemie (Abt. Oesterhelt) synthetisiert und direkt für PCR-Reaktionen eingesetzt. In der folgenden Übersicht sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

in 5'→3'-Orientierung angegeben. Das vor dem zu isolierenden DNA-Abschnitt lokalisierte Oligonukleotid wurde mit *fwd*, das danach lokalisierte wurde mit *rev* bezeichnet.

Oligonukleotide zur Klonierung von C33 mit und ohne ATG:

C33 fwd: TATGGATCCCAGAATGGGGGCAGG
rev: TATAATGCGGCCCGCCGTA CTTGGGGACCTTG
C33ΔATG fwd: TATGGATCCGGGGCAGGCTGTGTC

Oligonukleotide zur Klonierung von C-terminalen-C33-Deletionsmutanten:

C33d49 rev: TATAATGCGGCCCGCCTGAGGTTTGTAGGACGG
C33d80 rev: TATAATGCGGCCCGCCATTGACAGCACCGATAC
C33d119 rev: TATAATGCGGCCCGCCGATCTCCTTCTTCAGC
C33d255 rev: TATAATGCGGCCCGCCGTACCGGCACAAACATA

Oligonukleotide zur Klonierung von Mitgliedern der CD82-Familie:

CD82 fwd: ATATGAATTCCACCATGGGCTCAGCCTGTATCAAAGTC
rev: TATAATGCGGCCCGCCGTA CTTGGGGACCTTGCTGTAGTC
CD81 fwd: ATATGAATTCCACCATGGGAGTGGAGGGCTGC
rev: TATAATGCGGCCCGCCGTACACGGAGCTGTTCCGG
CD9 fwd: ATATGAATTCCACCATGCCGGTCAAAGGAGGCAC
rev: TATAATGCGGCCCGCCGACCATCTCGCGGTTCTGC
CD53 fwd: ATATGAATTCCACCATGGGCATGAGTAGCTTGAAACTG
rev: TATAATGCGGCCCGCCTAGCCCTATGGTCTGGCTGG
CD63 fwd: ATATGAATTCCACCATGGCGGTGGAAGGAGGAATG
rev: TATAATGCGGCCCGCCATCACCTCGTAGCCACTTCTG
CD37 fwd: ATATGAATTCCACCATGTCAGCCCAGGAGAGCTG
rev: TATAATGCGGCCCGCCACGGTATCGAGCGAGCCGG
CD151 fwd: ATATGAATTCCACCATGGGTGAGTTCAACGAG
rev: TATAATGCGGCCCGCCGTAGTGCTCCAGCTTGAG
CO-029 fwd: ATATGAATTCCACCATGGCAGGTGTGAGTGCCTG
rev: TATAATGCGGCCCGCCTTTGTTCCCGATCTGGCAATAC

2.5 Kits

ApoAlert AnnexinV-EGFP Apoptose Kit	Clontech, Palo Alto, USA
<i>Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit</i>	Perkin Elmer, Weiterstadt
BioRad <i>Protein Microassay</i>	BioRad, München
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Fugene6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Plasmid Mini, Midi bzw. Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAex II DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit (RNA-Isolation)	Qiagen, Hilden

2.6 Plasmide

In der Arbeit verwendete, aber nicht selbst konstruierte Plasmide sind im Folgenden aufgelistet:

zur Klonierung verwendete Plasmide:

pcDNA3	3,5 kbp großes Plasmid, mit CMV-Promoter zur Expression rekombinanter DNA in eukaryontischen Zellen; enthält eine Neomycin-Resistenzkassette (Invitrogen, Heidelberg)
pcDNA3 Δ	Derivat von pcDNA3 mit deletierter Neomycin-Resistenzkassette (Grimm und Leder, 1997)
pmyc Δ 1+2	Derivat von pcDNA3 Δ zur Herstellung myc-getaggtter Fusionsproteine; kloniert durch Austausch des Not I-Xba I-Fragments gegen die Sequenz des c-myc-Epitops (EQKLISEEDLN)
pHA1+2	Derivat von pcDNA3 Δ zur Herstellung Hämagglutinin (HA)-getaggtter Fusionsproteine; kloniert durch Austausch des Not I-Xba I-Fragments gegen die Sequenz des HA-Epitops (YPYDVPDYA)

pEYFP Derivat eines EYFP-Expressionsvektors (Clontech, Palo Alto, USA) zur Herstellung von Fusionsproteinen, die C-terminal mit EYFP verbunden sind und unter Kontrolle des CMV-Promotors stehen (hergestellt von A. Schubert, MPI für Biochemie, Martinsried). Erst die Insertion einer cDNA im richtigen Leseraster ermöglicht die Expression von EYFP.

als Positiv- und Negativkontrollen verwendete Plasmide:

pLantern GFP-Expressionsvektor (Gibco BRL, Eggenstein); cotransfiziert als Expressionskontrolle

p β -Gal cDNA von β -Galactosidase unter Kontrolle des LTR des Maloney-Maus-Leukämie-Virus' (Price et al., 1987) (erhalten von P. Leder, Harvard-University, USA)

pLucCMV cDNA von Leuchtkäfer-Luciferase (de Wet et al., 1987) unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pRcCMV (Invitrogen, Heidelberg)

pNedd2 cDNA von Caspase-2 (erhalten von S. Kumar, Adelaide, Australien) unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pRcCMV (5,5kb, Invitrogen, Heidelberg)

pRIP eukaryontischer Expressionsvektor für RIP, eine Komponente des TNF-Rezeptorkomplexes, die bei Überexpression Apoptose induziert (Grimm und Leder, 1997; Hsu et al., 1996a)

p53CMV cDNA von p53 (erhalten von M. Fritsche Freiburg) unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pRcCMV (Invitrogen, Heidelberg)

pAnt1 cDNA der Adenin-Nukleotid-Translokase 1 (Ant1) unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pcDNA3 Δ (Bauer et al., 1999)

Plasmide, die für membranassoziierte Proteine codieren:

pRK5-Herc	cDNA des EGF-Rezeptors unter Kontrolle des CMV-Promotors (erhalten von A. Ullrich, MPI für Biochemie)
pRK5-HerNA8	dominant-negativer EGF-Rezeptor (cytoplasmatische Domäne fehlend) unter Kontrolle des CMV-Promotors (erhalten von A. Ullrich, MPI für Biochemie)
pRK5-Her2	Her2 (c-erbB-2, neu) unter Kontrolle des CMV-Promotors (erhalten von A. Ullrich, MPI für Biochemie)
pcDNA3VSV PDGFR	cDNA des PDGF-Rezeptors unter Kontrolle des CMV-Promotors (erhalten von A. Ullrich, MPI für Biochemie)
pFneo- α 3-WT	eukaryontischer Expressionsvektor für Integrin- α 3 (<i>Culture Collection</i> , USA)
pECE- β 1	eukaryontischer Expressionsvektor für Integrin- β 1 (<i>Culture Collection</i> , USA)

Plasmide, die für Sauerstoffradikal-inaktivierende Enzyme codieren:

pcDNA3-Cat	eukaryontischer Expressionsvektor für humane Katalase unter Kontrolle des CMV-Promotors; erhalten von M. Tiedge, Hannover (Quan et al., 1986)
pcDNA3-CuZnSOD	eukaryontischer Expressionsvektor für Ratten-Cu-Zn-Superoxid-Dismutase unter Kontrolle des CMV-Promotors; erhalten von M. Tiedge, Hannover (Ho und Crapo, 1987)

Plasmide, die für Apoptose-Inhibitoren codieren:

pSFFV Bcl-2	eukaryontischer Expressionsvektor für Bcl-2 unter Kontrolle des SFFV-Promotors; erhalten von S. Korsmeyer, St. Louis, USA
pBcl-x _L HA	cDNA des Apoptose-Inhibitors Bcl-x _L inseriert in pHA1+2, unter Kontrolle des CMV-Promotors; (hergestellt von T. Mund, MPI für Biochemie, Martinsried)

pXIAP	cDNA des Apoptose-Inhibitors Bcl-x _L inseriert in pcDNA3Δ, unter Kontrolle des CMV-Promotors; (hergestellt von M.K.A. Bauer, MPI für Biochemie, Martinsried)
pIAP-2HA	cDNA des Apoptose-Inhibitors IAP-2 inseriert in pHA1+2, unter Kontrolle des CMV-Promotors; (hergestellt von M.K.A. Bauer, MPI für Biochemie, Martinsried)

2.7 Geräte

Brutschränke für Bakterien	Heraeus, Hanau
Durchflusscytometer: FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>E.coli</i> -Pulser (Elektroporationsgerät)	BioRad, München
Elektrophoresekammern	MPI für Biochemie, Martinsried
Geldokumentationssystem: Eagle Eye II	Stratagene, La Jolla, USA
Inkubatoren für Säugerzellen:	
Forma Scientific 3121 (21 % O ₂)	Forma Scientific, Marietta, USA
NuAire 2500E (1 % O ₂)	NuAire, Plymouth, USA
Kühlzentrifugen:	
5417 R	Eppendorf, Hamburg
4K15	Sigma, München
RC 5B Plus	Sorval, Bad Homburg
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop: Axiophot IM-35	Zeiss, Oberkochen
Zellkulturmikroskop: Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
PCR-Geräte:	
Mastercycler Personal	Eppendorf Hamburg
Mastercycler Gradient	Eppendorf Hamburg
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
PVDF-Membran: Hybond P	Amersham Pharmacia, Freiburg
Röntgenfilme: Biomax MR-1	Kodak, Rochester, USA
Spektrophotometer: DU 530	Beckman, München
Stromgeber: EPS 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
Tischzentrifugen: 5417 C	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch: UVT-14L	Herolab, Wiesloch
Vakuumentrifuge: Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

3 Methoden

3.1 Prokaryontische Zellkultur

3.1.1 Prokaryontische Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten mit rekombinanten Bakterien wurden in dafür vorgesehenen Einrichtungen (Bakteriensterilbank, auf 37°C temperierter Brutschrank und Schüttler) durchgeführt. Die Bakterien wurden in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten (LB-broth, Sigma, München) mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C kultiviert.

LB-Medium:

- 1 % Bacto-Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 0,5 % NaCl

3.1.2 Lagerung von Zellen

Von wichtigen Bakterienklonen wurden 0,85 ml einer Übernachtskultur mit 0,15 ml autoklavierter Glycerinlösung (87 %) gemischt und bei –80°C gelagert.

3.1.3 Bakterienstämme

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme *E. coli* Sure (Stratagene, La Jolla, USA) und *E. coli* DH5α (Hanahan, 1983) verwendet.

3.1.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Chemokompetente Zellen:

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli* wurden 100 ml Übernachtskultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Tetracyclin) bis zu einer OD (600 nm) von 1 herangezogen. Dann wurden die Bakterien gekühlt (10 min auf Eis), pelletiert (10 min 4.000 upm 4°C) und in 20 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterienpellets in 4 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, mit 830 µl 87 % Glycerin versetzt und in Aliquots à 50 µl bei –80°C gelagert.

Elektrokompetente Zellen:

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurde eine 1:10 verdünnte Übernachtskultur bis zu einer OD (600 nm) von 0,5-0,7 weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (15 min 5.000 upm 4°C). Die Pellets von 1 l Kultur wurden in 1 l eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert und erneut pelletiert. Es folgten zwei weitere Wasch- und Zentrifugationsschritte mit 500 bzw. 250 ml 10 % Glycerin. Dann wurde das Bakterienpellet in 4 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C verwahrt.

3.1.5 Transformation von Bakterienzellen

Chemotransformation:

Chemokompetente Bakterien (50 µl Aliquots) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,01-1,0 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde durch 1,5-minütigen Hitzeschock bei 42°C und nachfolgende Kühlung (1 min auf Eis) die DNA in die Bakterien eingebracht. Danach wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und zur Resistenzexpression 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (30 sec 5.000 g) und in 50 µl SOC-Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

SOC-Medium:

- 2 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 0,01 M NaCl
- 0,01 M MgCl₂
- 0,01 M MgSO₄
- 2,5 mM KCl
- 0,02 M Glucose

Elektrotransformation:

Elektrokompetente Zellen (50 µl Aliquot) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,01-1,0 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Bakterien-DNA-Gemisch in Elektroporationsküvetten (BioRad, München) gegeben und unter Verwendung einer Elektroporationskammer (1,8 kV in *E.coli*-Pulser BioRad, München) elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 30 min bei 37°C

inkubiert. Danach wurden sie pelletiert (30 sec 5.000 g) und in 50 µl SOC-Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

3.2 Eukaryontische Zellkultur

3.2.1 Eukaryontische Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial (Greiner, Solingen; Nunc, Wiesbaden) ausgeführt.

Die Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, in Medium bei 37°C, 21 % O₂, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) kultiviert. Das Medium wurde mit 5 % (293T-Zellen) oder 10 % fötalem Kälberserum (FKS, alle anderen Zelllinien), 2 mM Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat sowie 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin supplementiert. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die für verwendeten Zelllinien und Kulturmedien sowie über weitere Medienzusätze, die bei einzelnen Zelllinien zugegeben wurden.

Wenn die Zelldichte eine Konfluenz von ca. 80 % erreichte, bzw. wenigstens alle 3 Tage, wurden die Zellen geteilt: Hierzu wurden sie mit PBS gewaschen und durch Inkubation in Trypsin (1 % in PBS) für ca. 3 min bei 37°C abgelöst. Sobald die Zellen in Suspension gingen, wurden sie in Kulturmedium mit FKS überführt und 2 min bei 1.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit etwa 10-40 % Konfluenz ausgesät.

10x PBS: 100 mM Na₂HPO₄
 50 mM NaH₂PO₄
 54 mM KCl
 137 mM NaCl

3.2.2 Lagerung eukaryontischer Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen trypsiniert, pelletiert und in Nährmedium resuspendiert (siehe 3.2.2). Dann wurden die Zellen zusätzlich mit 10 % FKS sowie 10 % DMSO versetzt, in 2 ml Kryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) aliquotiert und im Gefrierschrank langsam auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen

Stickstoff überführt. Gelagerte Zellen wurden durch rasches Erwärmen getaut und sofort in frischem Medium 1:20 verdünnt ausgesät.

3.2.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die bei den einzelnen Zelllinien verwendeten Transfektionsmethoden. Vor jeder Transfektion wurden die Zellen in geeignete Formate ausgesät. Je nach Zelllinie erfolgte die Transfektion 5 h (HeLa) bis 2 Tage (293T) nach dem Aussäen der Zellen bei etwa 40 bis 70 % Konfluenz. Vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die einzelnen Transfektionsmethoden werden im Folgenden beschrieben.

Calciumphosphat-Transfektion:

Diese Methode basiert auf der Copräzipitation von DNA und Ca-Phosphat (Graham und van der Eb, 1973). Daher wurde 1 Volumen in Millipore-Wasser gelöste DNA mit 1/9 Volumen 2,5 M CaCl_2 versetzt. Anschließend wurde zur Präzipitatbildung 1,1 Volumen 2xHBS pH 6,9-7,1 tropfenweise zugegeben und 5-15 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Präzipitat vorsichtig auf die Zellen gegeben. Je nach Zelllinie wurde nach 5 h (293T, MCF-7) oder Über-Nacht-Inkubation (HeLa, PC3, LNCaP) das Kulturmedium gewechselt, um das Präzipitat von den Zellen zu entfernen.

Für eine Transfektion im 6-*well*-Format wurden beispielsweise für ein *well* 2,5 μg DNA in 70 μl Millipore-Wasser verdünnt und mit 7,5 μl 2,5 M CaCl_2 sowie 75 μl 2xHBS versetzt.

2xHBS: 4 g NaCl
 0,19 g KCl
 2,4 g HEPES
 0,06 g Na_2HPO_4
 ad 250 ml Millipore-Wasser
 pH 6,9-7,1 einstellen mit 1 N NaOH und sterilfiltrieren

Bei einigen Zelllinien (PC3, LNCaP und MCF-7) wurde direkt vor dem zweiten Mediumwechsel ein Glycerin-Schock durchgeführt: Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt. Dann wurden die Zellen für 1 min mit 25 % Glycerin (in PBS) inkubiert, bevor durch dreimaliges Waschen mit PBS Glycerinreste entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium weiterkultiviert.

Tabelle 3.1 Zelllinien, Kulturmedien und Transfektionsmethoden

Zelllinie	Beschreibung	Quelle	Kulturmedium	Transfektionsmethode
293T	humane embryonale Nierenzellen	P. Leder, Harvard-University, USA	DMEM	Ca-Phosphat mit 40 μ M Chloroquin
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	K. Schulze-Osthoff, Münster	DMEM	Ca-Phosphat oder Effectene
HeLa ρ 0	HeLa-Derivat ohne mitochondriale DNA	S. Grimm, MPI f. Biochemie	DMEM mit 50 μ g/ml Uridin	Ca-Phosphat oder Effectene
HeLa Suspensionszellen	HeLa-Derivat, in Suspension wachsend	F. Melchior, MPI f. Biochemie	Joklik modifiziertes MEM	Ca-Phosphat
HeLa (1 % O ₂)			DMEM mit 1x MEM-nicht essentiellen Aminosäuren	Effectene
PC3	humane Prostatakarzinomzellen	R. Riesenberg, LMU München	RPMI; Transfektion DMEM mit CT-FKS	Ca-Phosphat mit Glycerin-Schock
DU145	humane Prostatakarzinomzellen	R. Riesenberg, LMU München	RPMI	Superfect
LNCaP	humane Prostatakarzinomzellen	R. Riesenberg, LMU München	RPMI, Transfektion DMEM mit CT-FKS	Ca-Phosphat mit 10 μ M Chloroquin und Glycerin-Schock
MCF-7	humane Mammakarzinomzellen	P. Bächerle, Freiburg	DMEM	Ca-Phosphat mit Glycerin-Schock
Rat1	Fibroblasten (Ratte)	A. Ullrich, MPI f. Biochemie	DMEM	Fugene6
GD25	Fibroblasten (Maus), defizient für β 1-Integrin	R. Fässler/T. Sakai, MPI f. Biochemie	DMEM	-
β 1 GD25	GD25-Derivat mit rekontituiertem β 1-Integrin	R. Fässler/T. Sakai, MPI f. Biochemie	DMEM, 10 μ g/ml Puromycin	-

Transfektion mit Effectene oder Fugene6:

Die Transfektionen wurden nach Angaben der Hersteller (Qiagen, Hilden bzw. Roche, Mannheim) durchgeführt. Beispielsweise wurden für die Transfektion von HeLa-Zellen mit

Effectene im 12-well-Format 125 ng DNA in 50 µl EC-Puffer verdünnt, mit 0,8 µl *Enhancer* versetzt und 7 min bei RT inkubiert. Danach wurde 1 µl Effectene zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz mit 250 µl Kulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben.

3.2.4 Herstellung von HeLa-Zellen ohne mitochondriale DNA (ρ 0-Zellen)

Um HeLa ρ 0-Zellen zu erhalten, wurden HeLa-Zellen zwei Monate in Medium mit 100 µg/ml Ethidiumbromid sowie 50 µg/ml Uridin und 100 µg/ml Pyruvat kultiviert (King und Attardi, 1989). Durch die fortdauernde Ethidiumbromid-Exposition wurde die mitochondriale DNA zerstört, was durch Überprüfung der Uridinabhängigkeit des Wachstums getestet wurde. Ein weiterer Indikator für den Verlust der mitochondrialen DNA ist die fehlende Expression der mitochondrial codierten Cytochrom c-Oxidase (Daten von A. Schubert, MPI für Biochemie).

3.3 DNA-Arbeitsmethoden

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmidminipräparationen:

Zur Präparation von DNA im kleinen Maßstab wurde das Plasmid Mini Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Dabei werden die Bakterien durch alkalische Lyse lysiert und ihre DNA wird über Säulen aufgereinigt.

Alternativ wurde Plasmid-DNA aus Bakterien zur schnellen Überprüfung von Bakterienklonen ohne Säulen, ebenfalls durch alkalische Lyse aufgereinigt (Birnboim und Doly, 1979). Hierzu wurden die Bakterien pelletiert (15 sec 20.800 g) und in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl Puffer P2 lysiert (5 min bei RT). Dabei werden die Proteine durch SDS, die chromosomale und auch die Plasmid-DNA durch die alkalischen Bedingungen denaturiert und die RNA im Verlauf der Reinigung durch RNase A degradiert. Im nächsten Schritt wurde die Suspension durch Zugabe von 150 µl Puffer P3 neutralisiert und 5 min auf Eis inkubiert. Durch die hohe Salzkonzentration präzipitieren dabei denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS. Im Gegensatz dazu renaturiert bei diesem Schritt die Plasmid-DNA aufgrund ihrer zirkulären Struktur und bleibt in Lösung. In der nun folgenden Zentrifugation

(5 min 20.800 g) wurden die Zellreste und präzipitierten Zellkomponenten pelletiert. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe von 800 µl Ethanol gefällt. Direkt anschließend wurde erneut zentrifugiert (5 min 20.800 g). Das erhaltene Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 20 µl Millipore-Wasser gelöst und stand für Restriktionsanalysen zur Verfügung.

Puffer P1: 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA

Puffer P2: 200 mM NaOH, 1 % SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5 mit Eisessig

Puffer P4: 2,5 % SDS in Isopropanol

Isolierung von Plasmid-DNA im 96-well-Format:

Die gleichzeitige Isolation von Plasmid-DNA vieler verschiedener Klone wurde wie beschrieben im 96-well-Format ausgeführt (Neudecker und Grimm, 2000): Hierzu wurden 96-deep well-Blöcke (Qiagen, Hilden) mit Bakterien angeimpft und 2 Tage kultiviert. Dann wurden die Blöcke mit den Bakterien abzentrifugiert (Sigma-Kühlzentrifuge 4K15, 3.000 g, 5 min). Die Pellets wurden in jeweils 170 µl Puffer P1 durch Vortexen resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 170 µl Puffer P2 lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Lyse durch Zusatz von je 170 µl Puffer P3 unterbrochen. Die Blöcke wurden anschließend 5 min bei 6.000 g zentrifugiert und der Überstand in frische 96-deep well-Blöcke überführt. Dann wurden je well 100 µl Puffer P4 zugesetzt und die Suspension 45 min bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Blöcke 10 min bei 6.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in 96-well Polyoxymethyl-Mikrotiterplatten überführt und mit je 150 µl Siliciumdioxidsuspension versetzt. Die Platten wurden 20 min bei RT inkubiert, wodurch die DNA an die Silikaoberfläche binden konnte. Anschließend wurden die Platten 5 min bei 6.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Silikapellets wurden mit je 400 µl kaltem (-20°C) Aceton gewaschen und 30 sec gevortext. Anschließend wurden die Blöcke 3 min bei 6.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Platten wurden 5 min in Vakuumkammern bei RT getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit je 75 µl 60°C warmem Millipore-Wasser eluiert. Die Blöcke wurden 10 min bei 6.000 g zentrifugiert, um das Silikamaterial zu pelletieren. Schließlich wurden die Plasmid-DNA-haltigen Überstände in 96-well Mikrotiterplatten überführt und bei -20°C gelagert.

Silika-Suspension: 50 g Siliciumdioxid
 300 µl HCl (konz.)
 ad 1 l Millipore-Wasser
 1 h bei 121°C autoklavieren

Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Um große Mengen Lipopolysaccharid-armer DNA zu erhalten, die für die Transfektion von Säugerzellen geeignet ist, wurde das Plasmid Midi oder Maxi Kit von Qiagen, Hilden nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Es basiert ebenfalls auf der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Die DNA wird dann über Anionenaustauscher-Säulen, die selektiv doppelsträngige DNA binden, und durch Isopropanol-Fällung aufgereinigt und schließlich in Wasser aufgenommen.

3.3.2 Überprüfung der DNA-Konzentration und Reinheit

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde ihre optische Dichte nach Schleif und Wensink bei 260 nm bestimmt (Schleif und Wensink, 1981). Dabei entspricht eine OD (260 nm)-Einheit einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wurde zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge haben die aromatischen Aminosäuren der Proteine ihr Absorptionsmaximum; daher kann aus dem Quotienten OD (260 nm) / OD (280 nm) auf die Reinheit der DNA geschlossen werden. Der Quotient sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur spezifischen exponentiellen Vermehrung von DNA zwischen zwei Oligonukleotiden verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem *Expand Long Template* PCR-System von Roche, Mannheim durchgeführt. Dabei wurde der folgende Reaktionsansatz gewählt:

PCR-Ansatz: 39,5 µl Millipore-Wasser
 5 µl PCR-Puffer 3
 2,5 µl 25 mM MgCl₂
 100 ng DNA-*template* (Plasmid oder cDNA)
 1 µl *fwd*-Oligonukleotid (10 µM)

1 μ l *rev*-Oligonukleotid (10 μ M)
 1 μ l dNTPs (25 mM je dNTP)
 0,75 μ l Polymerase (3,5 U/ μ l)

Für die Amplifikation wurden – abhängig von der eingesetzten DNA-Menge – 28 bis 40 Zyklen verwendet. Ein PCR-Zyklus bestand aus der Denaturierung der DNA (30 sec 94°C), dem Anhybridisieren der Primer bei 40-60°C (je nach Zusammensetzung und Länge der Primer) und der 3'-Verlängerung der Primer durch die Polymerase bei 68°C (1 min pro 1.000 bp). Das Gelingen der Amplifikation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Reinigung, Trennung und Identifizierung von DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden die DNA-haltigen Proben mit 1/6 Volumen Probenpuffer auf 0,6-2 %ige Agarose-TAE-Gele aufgetragen und in TAE-Puffer im elektrischen Feld aufgetrennt. Als Referenz dienten definierte Größenmarker mit Vielfachen von 100 bp oder 1 kbp (Eurogentec, Seraing, Belgien).

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einem Färbebad mit 10 μ g/ml Ethidiumbromid in TAE gefärbt. Anschließend wurde in einem Wasserbad die unspezifische Färbung entfernt. DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators visualisiert und mit einer Videokamera (Eagle-Eye II, Stratagene, La Jolla, USA) dokumentiert.

6x Probenpuffer:

- 40 mg Xylencyanol
- 40 mg Bromphenolblau
- 5 ml Glycerin
- 5 ml Millipore-Wasser
- 20 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0

50x TAE-Puffer:

- 121 g Tris-Base
- 28,5 ml Eisessig
- 50 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
- 420 ml Millipore-Wasser

3.3.5 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurden die entsprechenden, im langwelligem UV-Licht sichtbaren Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit den Kits *Qiaex II* oder *Qia Quick Spin* nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

3.3.6 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisierung

Die Phenol-Chloroformextraktion (modifiziert nach Kirby (Kirby, 1957)) wurde verwendet, um DNA von störenden Proteinen – beispielsweise nach Restriktionsspaltungen – zu befreien.

Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8) versetzt und gut durchmischt. Dadurch werden DNasen, RNasen, Ligasen und andere Proteine denaturiert und in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase angereichert. Zur besseren Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei 20.800 g zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, durchmischt und zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA wurde durch Ethanol-Natriumacetat gefällt (siehe Abschnitt 3.3.7).

3.3.7 Präzipitation von Nukleinsäuren

Gelöste DNA wurde – nach der Vorschrift von Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) – durch Ethanol-Natriumacetat-Präzipitation aufkonzentriert und gereinigt. Dabei wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen 100 % Ethanol und einstündiger Inkubation bei -80°C wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 20.800 g) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und 15 min bei RT getrocknet. Schließlich wurde die DNA in wenig Millipore-Wasser gelöst.

3.3.8 Enzymatische Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen der DNA und hydrolysieren bestimmte Phosphodiesterbindungen innerhalb dieser Regionen. Dies ermöglicht das Heraustrennen definierter Sequenzen aus der DNA. Restriktionsspaltungen

wurden nach Angaben des Enzymherstellers unter geeigneten Pufferbedingungen durchgeführt. Dabei wurde ein Reaktionsvolumen von 10 μl pro μg DNA gewählt; die Inkubationsdauer lag zwischen 30 min und 5 h. Zur Kontrolle der Spaltung wurde die DNA gelelektrophoretisch analysiert (siehe Abschnitt 3.3.4).

3.3.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurden 200 ng der linearisierten Vektor-DNA mit einem zwei- bis dreifachen molaren Überschuss des Fragments in einem Gesamtvolumen von 20 μl verwendet. Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase wurden nach den Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt) zugegeben. Nach 45 min Inkubation bei RT oder Übernachtinkubation bei 16°C wurde die Ligase durch Erhitzen (5 min 65°C) inaktiviert. Die ligierte DNA wurde entweder direkt zur Chemotransformation verwendet oder gefällt und durch Elektroporation in Bakterien eingebracht (siehe Abschnitte 3.1.5 und 3.3.7).

3.3.10 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurden diese mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten dNTPs automatisch sequenziert. Hierzu wurde eine Sequenzierreaktion mit 500 ng DNA, 8 pmol Oligonukleotiden und 4 μl des *big-dye-Terminator cycle sequencing ready reaction kit* (Perkin Elmer, Weiterstadt) in einem Volumen von 20 μl durchgeführt. Diese umfasste 35 Zyklen mit 10 sec Denaturierung bei 96°C, 5 sec Hybridisierung bei 50°C und 4 min Synthese bei 60°C. Anschließend wurden die Proben mit 30 μl Millipore-Wasser, 3 μl 3 M Natriumacetat und 50 μl 100 % Ethanol (RT) versetzt, gevortext und 20 min zentrifugiert (20 min 20.800 g RT). Die dabei gefällte DNA wurde mit 100 μl 70 % Ethanol gewaschen, 10 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde die DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet und durch die Firma SeqLab (Göttingen) automatisch sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden editiert und mit den entsprechenden Datenbankeinträgen abgeglichen. Nur Plasmide mit Sequenzen, die in ihrer Aminosäureabfolge mit den Datenbankeinträgen völlig übereinstimmten, wurden für weitergehende Experimente verwendet.

3.4 RNA-Arbeitsmethoden

3.4.1 RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen wurden zwei 15 cm Schalen 293T- oder HeLa-Zellen mit einer Konfluenz von 60-70 % verwendet: Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 ml TriPure (Roche, Mannheim) versetzt. Mit Hilfe einer umgebogenen Kanüle wurden die Zellen von der Platte gelöst und durch 10-maliges Auf- und Abziehen lysiert. Dabei wurden durch das in TriPure enthaltene Phenol und Guanidinthiocyanat Proteine, also auch RNasen, denaturiert. Anschließend wurde das Lysat in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Jeweils 1 ml Zelllysate wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, gevortext und nach 10 min Inkubation bei RT zentrifugiert (15 min 20.800 g 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt, gevortext und zur Präzipitation der RNA mindestens eine Stunde bei –80°C inkubiert. Danach wurde 30 min zentrifugiert (20.800 g 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in frischem Millipore-Wasser gelöst (15 min auf Eis). Nach der Präparation wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Alternativ wurde zur Präparation von RNA das *RNeasy*-Kit verwendet, wobei in allen Punkten den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) gefolgt wurde.

3.4.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurde RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese wiederum wurde zur Amplifizierung bestimmter Sequenzen mittels PCR (siehe Abschnitt 3.3.3) genutzt. Die reverse Transkription wurde nach den Angaben des Enzymherstellers (Gibco BRL, Eggenstein) durchgeführt. Dabei wurden 3 µg RNA mit 2 µl OligodT-Primern (0,5 µg/µl) in einem Volumen von 24 µl für 5 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 8 µl 5xErststrangsynthese-Reaktionspuffer, 4 µl 0,1 M DTT und 2 µl dNTPs (10 mM pro dNTP) versetzt. Anschließend wurde 2 min bei 42°C inkubiert, bevor 2 µl (200 U) *SuperscriptII*-Enzym zugesetzt wurden. Die cDNA-Synthese erfolgte durch einstündige Inkubation bei 42°C. Abschließend wurde das Enzym durch Erhitzen inaktiviert (15 min 70°C). Die so erhaltene cDNA wurde bei –20°C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

3.5 Apoptose-Tests

3.5.1 DNA-Leiter

Zum Nachweis der internukleosomalen Spaltung von DNA, die ein Charakteristikum für Apoptose ist, wurde eine 10 cm-Schale 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden transfiziert. Nachdem Apoptose phänotypisch sichtbar war, wurden die Zellen abgeschabt, zentrifugiert (10 min 1.000 g 4°C) und mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 600 µl hypotonem Lysepuffer B aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 20.800 g zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA-Fragmente enthalten sollte, wurde abgenommen und mit 560 µl Phenol versetzt, 1 min gevortext und zentrifugiert (10 min 20.800 g). Die obere Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) vermischt. Dazu wurde wiederum 1 min gevortext. Anschließend wurde 10 min bei 20.800 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 30 µl 5 M NaCl und 1 ml kaltem Ethanol (−20°C) vermischt. Durch Lagerung bei −20°C (mindestens 2 h) wurde die DNA gefällt. Danach wurde sie durch Zentrifugation pelletiert (20 min 20.800 g 4°C); der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 300 µl kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen und 5 h bei 50°C gelöst. Dann wurden 3 µl RNaseA (10 mg/ml) zugesetzt und 60 min bei 37°C inkubiert, um die noch enthaltene RNA zu degradieren. Die Lösung wurde in farbstofffreiem Probenpuffer aufgenommen und auf einem 2 %igen Agarose-Gel bei 60 V für 2,5 h aufgetrennt.

hypotoner Lyse-Puffer B:

- 95,5 ml Millipore-Wasser
- 500 µl 2 M Tris pH 7,2
- 2 ml 0,5 M EDTA
- 200 µl TritonX 100

3.5.2 Nachweis hypodiploider DNA

Bedingt durch die internukleosomale Spaltung der DNA verlieren die Zellkerne im Verlauf der Apoptose zunehmend DNA: ihr DNA-Gehalt sinkt somit und wird hypodiploid (Vermees et al., 2000). Der Anteil der Zellkerne mit hypodiploider, sogenannter sub-G1-DNA, wurde durchflusscytometrisch nach Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid bestimmt (Bauer et

al., 1999). Dazu wurden nach geeigneten Apoptose-Induktionszeiten die Zellüberstände ebenso wie die durch Trypsinieren geernteten Zellen abzentrifugiert (10 min 1.500 g 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, um keine apoptotischen Zellen zu verlieren. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Falls in den Ansätzen GFP cotransfiziert war, wurden 100 µl der Zellsuspension abgenommen und zur durchflusscytometrischen Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendet. Der Rest der Zellsuspension wurde mit 1,5 Volumen hypotonem PI-Lyse-Puffer (0,1 % Na₃Citrat, 0,1 % Triton X-100, 20 µg/ml Propidiumiodid in PBS) versetzt. Dadurch wurden die Zellen lysiert, die Kerne freigesetzt und die DNA durch das im Puffer enthaltene Propidiumiodid angefärbt.

Die so präparierten Zellen wurden nun im Durchflusscytometer im Kanal FL2 mit dem Programm *Cellquest* analysiert. Dabei wurden je nach Anzahl der Parallelmessungen zwischen 2.500 und 10.000 Zellen pro Probe vermessen. Zur Bestimmung des Anteils von Zellkernen mit hypodiploider DNA in einer Probe wurden die Messergebnisse als Histogramm dargestellt und der Anteil von Kernen mit Sub-G1-DNA in Relation zu der Gesamtheit der Kerne (Kerne in Sub-G1, G1, S und G2) gesetzt. Zur Bestimmung der spezifischen Apoptose wurden von den Messwerten jeweils die Werte der unbehandelten oder mit Luciferase oder β-Galactosidase transfizierten Proben abgezogen.

3.5.3 Phosphatidylserin-Detektion

Das Auftreten von Phosphatidylserin in der äußeren Hälfte des Cytoplasmamembran-Doppelschicht ist ein Indikator für Apoptose. Es lässt sich detektieren durch die Zugabe von Farbstoff-gekoppeltem AnnexinV zu den intakten Zellen, da Annexin spezifisch an Phosphatidylserin bindet.

Detektion der Phosphatidylserin-Exposition mit GFP-Annexin:

Hierzu wurde das *ApoAlert AnnexinV-EGFP Apoptosis Kit* von Clontech (Palo Alto, USA) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Dabei wurden die Zellen mit EGFP-gekoppeltem AnnexinV unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Nach dem Entfernen von unspezifisch gebundenem AnnexinV-EGFP wurde das Ergebnis im Mikroskop betrachtet und durch Photographieren dokumentiert: An Zellen mit Phosphatidylserin in der äußeren Membranhälfte hatte AnnexinV gebunden; sie leuchteten im Fluoreszenzlicht grün, während nicht-apoptotische Kontrollzellen keine Fluoreszenz zeigten.

Detektion der Phosphatidylserin-Exposition mit Annexin-TC:

Zur durchflusscytometrischen Detektion der Phosphatidylserin-Exposition wurden 10^5 Zellen nach dem AnnexinV-Biotin-Färbeprotokoll von Pharmingen (San Diego, USA) zunächst trypsiniert, mit PBS gewaschen und in einem Volumen von 100 μ l 15 min unter geeigneten Pufferbedingungen mit 5 μ l Biotin-konjugiertem AnnexinV bei RT inkubiert. Die Zellen wurden danach zentrifugiert (5 min 1.500 g) und mit Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurden sie in 100 μ l Bindepuffer mit 2,5 μ l Streptavidin gekoppeltem Tricolor-Farbstoff (Caltag Laboratories, Burlingame, USA) 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert, wodurch der Farbstoff über Biotin-Streptavidin-Bindung an Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin gekoppelt wurde. Schließlich wurde die Zellsuspension mit 400 μ l Bindepuffer verdünnt und durchflusscytometrisch analysiert.

3.6 Proteinchemische Methoden

3.6.1 Herstellung von Zellextrakten

Zum Nachweis verschiedener Proteine im Western-Blot mussten Zellextrakte hergestellt werden. Davon abhängig, in welchem Zellkompartiment das Protein erwartet wurde, wurden verschiedene Lyseprotokolle verwendet.

Cytoplasmatische Extrakte zum Nachweis von cytoplasmatischem Cytochrom c:

Zu einem geeigneten Zeitpunkt nach Apoptoseinduktion wurden die Zellen einer 10 cm-Schale geerntet, in PBS gewaschen und in Puffer A resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch 10-maliges Auf- und Abziehen mit Hilfe einer 22G-Kanüle homogenisiert. Durch Zentrifugation mit 750 g (10 min 4°C) wurden die Kerne und unvollständig lysierte Zellreste pelletiert. Die Überstände wurden nun bei 10.000 g zentrifugiert (10 min 4°C), um die Mitochondrien abzutrennen. Die so erhaltenen cytoplasmatischen Überstände wurden in der SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.6.3) eingesetzt.

<i>Puffer A:</i>	250 mM Saccharose	1 mM EGTA
	20 mM HEPES pH 7,5	1 mM Dithiothreitol
	1,5 mM MgCl ₂	0,1 mM PMSF
	10 mM KCl	10 μ g/ml Leupeptin
	1 mM EDTA	10 μ g/ml Aprotinin

Kernextrakte zum Nachweis von PARP-Spaltprodukten:

Zur Extraktion nukleärer Proteine wurde das 750 g-Pellet, das bei der Herstellung cytoplasmatischer Extrakte angefallen war, verwendet. Die darin enthaltenen Zellkerne wurden in 80 µl Mercapto-Urea-Probenpuffer aufgenommen. Durch 5-maliges Auf- und Abziehen in einer 22G-Kanüle wurden die Kerne lysiert und die chromosomale DNA geschert. Die so aufbereiteten Proben wurden für SDS-PAGE verwendet.

Mercapto-Urea-

Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 6,8
 6 M Harnstoff
 6 % β-Mercaptoethanol
 3 % SDS
 0,004 % Bromphenolblau

Extrakte mit solubilisierten Membranproteinen zum CD82-Expressionsnachweis:

Die Extraktion integraler Proteine der Cytoplasmamembran wurde nach den Angaben von (Pique et al., 2000) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einer 10 cm-Schale geerntet und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in Lysepuffer (1 % CHAPS und *Complete Mini*-Protease-Inhibitoren in TBS) resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert und der membranprotein-haltige Überstand zur SDS-PAGE eingesetzt.

TBS: 150 mM NaCl
 10 mM Tris pH 7,3

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit Hilfe des *Protein Microassay* von BioRad (München) bestimmt (Bradford, 1976), um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE eingesetzt werden. Der Nachweis, der nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, beruht auf der Interaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl 1:10 verdünnter Zellextrakt mit 1 ml 1:5 verdünntem Reagenz versetzt, für wenige Minuten bei

RT inkubiert und photometrisch analysiert. Die Konzentration wurde durch den Vergleich mit einer BSA-Standardkurve ermittelt.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden, wie von Laemmli beschrieben (Laemmli, 1970), durch eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit 40 mA aufgetrennt.

Direkt vor der Elektrophorese wurden die zu analysierenden Proben mit 2xSDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und auf die Gele aufgetragen. Je nach Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine wurden 5-15 %ige Polyacrylamid-Trenngele verwendet (Sambrook et al., 1989).

2xSDS-Ladepuffer:

- 200 mM Tris HCl pH 6,8
- 6 % SDS
- 24 % Glycerin
- 9 % β -Mercaptoethanol
- 250 mg/ml Bromphenolblau

Gel-Matrix für 10 ml Gel:	Sammelgel	Trenngel (10 %)
Millipore-Wasser	2,7 ml	4 ml
30 %-Acrylamid-Lösung	670 μ l	3,3 ml
1 M Tris HCl pH 6,8	500 μ l	-
1,5 M Tris HCl pH 8,8	-	2,5 ml
10 % SDS	40 μ l	100 μ l
10 % Ammoniumperoxodisulfat	40 μ l	100 μ l
TEMED	4 μ l	4 μ l

Laufpuffer:

- 25 mM Tris-HCl
- 250 mM Glycin pH 8,3
- 0,1 % SDS

3.6.4 Western-Blot

Proteine, die mit SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden elektrophoretisch mit der Western-Blot Technik in einer *semi-dry*-Apparatur auf Hybond-ECL-Membranen (Amersham Pharmacia, Freiburg) transferiert. Dazu wurden das Gel, die mit Methanol aktivierte Membran, sowie in Transferpuffer getränkte, auf Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere (Whatman 3MM) luftblasenfrei in die Blotkammer gelegt. Der Transfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h.

Transferpuffer: 48 mM Tris-Base
 39 mM Glycin
 0,037 % SDS
 20 % Methanol

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver in TBS-T bei 4°C über Nacht oder in 1h bei RT abgesättigt. Dann wurde die Membran zweimal mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper in geeigneter Verdünnung in 5 % Milchpulver/TBS-T zugegeben und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran fünfmal für 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor der sekundäre, Meerrettichperoxidase (HRP)-markierte Antikörper in TBS-T mit der Membran 1 h bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran erneut fünfmal 5 min mit TBS-T gewaschen.

TBS-T: 150 mM NaCl
 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 0,05 % Tween 20

3.6.5 Chemilumineszenz-Detektion von Proteinen

Die durch den sekundären Antikörper markierten Proteine wurden durch eine Meerrettichperoxidase (HRP)-katalysierte Chemilumineszenzreaktion (*enhanced chemiluminescence ECL*) nachgewiesen. Hierzu wurde das *Super signal West pico chemiluminescent*-Substrat bzw. bei schwachen Signalen das *Super signal West femto maximum sensitivity*-Substrat von PIERCE (Rockford, USA) verwendet. Dazu wurden in einer Dunkelkammer gleiche Teile der ECL-Lösungen A und B gemischt und auf die mit Antikörpern behandelte

Membran gegeben. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt, um das Ergebnis des Western-Blots zu dokumentieren.

3.6.6 Ponceau S-Färbung von Proteinen

Um die Auftragung gleicher Proteinmengen und die Effizienz des Western-Blot-Transfers zu überprüfen, wurden die Proteine auf der Membran reversibel angefärbt. Dazu wurde die Membran 1 min mit dem Farbstoff Ponceau S (2,5 % in PBS) inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T sukzessive entfärbt, so dass die Proteinmengen in den verschiedenen Spuren des Gels verglichen werden konnten.

3.7 Reportergentests

Zur Überprüfung der Expression der als Negativkontrollen verwendeten Konstrukte pLuc und p β -Gal wurden folgende Reportergentests durchgeführt.

3.7.1 Luciferase-Test

Um die Expression transfizierter Luciferase zu testen, wurden die Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in 150 μ l Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 4°C lysiert und 5 min abzentrifugiert (20.800 g 4°C). 50 μ l Überstand wurden abgenommen und im Luminometer automatisch mit 100 μ l Luciferin-Lösung versetzt und über 5 sec hinweg analysiert.

<i>Lysepuffer:</i>	25 mM Glycylglycin	<i>Luciferin-Lösung:</i>	55 μ g/ml Luciferin
	1 % TritonX-100		3,3 mg/ml Glycylglycin
	15 mM MgSO ₄		3,0 mg/ml ATP
	4 mM EGTA pH8,0		
	1 mM DTT		

3.7.2 β -Galactosidase-Test (CPRG)

Der Nachweis der Expression transfizierter β -Galactosidase erfolgte mittels Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid (CPRG). Das Substrat CPRG wird enzymatisch von β -Galactosidase umgesetzt, wodurch es zu einem Farbumschlag von gelb nach rot kommt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert, gewaschen und mit 500 μ l 0,2 % TritonX-100 (in PBS) lysiert. Das

Zellysate wurden nun mit 200 μ l CPRG-Mix versetzt und bei 37°C inkubiert. Je nach Stärke der β -Galactosidase-Expression wurde nach 20 min oder 2 h die OD (574 nm) photometrisch bestimmt.

<i>CPRG-Mix:</i>	660 μ l 13 mM CPRG	<i>100xMg:</i>	100 μ l 1 M MgCl ₂
	2,3 ml Puffer P		300 μ l β -Mercaptoethanol
	30 μ l 100xMg-Lösung		600 μ l Millipore-Wasser

<i>Puffer P:</i>	41 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄
	9 ml 0,2 M NaH ₂ PO ₄
	50 ml Millipore-Wasser

3.8 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Zur durchflusscytometrischen Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ wurde der Farbstoff 3,3'-Dihexyloxycarbocyanin-iodid (DiOC₆(3)) (Molecular Probes, Leiden, NL) verwendet. Dieser wird nur in Mitochondrien mit starkem Membranpotential aufgenommen. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in 200 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 40 μ l 1:1.000 verdünnter 0,5 mM DiOC₆(3)-Stammlösung wurden die Zellen exakt 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit 1 μ l 5 mM CCCP versetzt, welches als Entkoppler wirkt und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Direkt im Anschluss wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und durchflusscytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Histogrammdarstellung der im Kanal FL3 gemessenen Daten. Dabei wurde der Anteil schwächer fluoreszierender Zellen in Verhältnis zu allen gemessenen Zellen ausgewertet.

3.9 Bestimmung der Superoxidanion-Bildung

Der Nachweis der Superoxidanion-Bildung beruht auf der Oxidation von Hydroethidin (HE) zu Ethidiumbromid, welches in die zelluläre DNA interkaliert und durchflusscytometrisch erfasst werden kann (Li et al., 1999). Die Zellen je eines 12-well-Platten-wells wurden trypsiniert, zentrifugiert und in 200 μ l PBS resuspendiert. Als Positivkontrolle wurden einige Ansätze mit 2,5 μ l 0,33 % Wasserstoffperoxid versetzt und 15 min bei 37°C und 5 %

CO₂ vorinkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze mit 10 µM HE (Molecular Probes, Leiden, NL) versetzt und 30 min im Dunkeln inkubiert (37°C 5 % CO₂). Danach wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und sofort durchflusscytometrisch analysiert. Für die Auswertung wurde in einer Histogrammdarstellung der FL3-Daten der Anteil Zellen mit starker Fluoreszenz (erhöhtem Ethidiumbromid-Gehalt aufgrund verstärkter Hydroethidin-Oxidation) an der Gesamtzellpopulation ermittelt.

3.10 Analyse und Anreicherung CD82-positiver Zellen

3.10.1 Bestimmung der CD82-Expression

Die Expressionsstärke von CD82, welches ein integrales Protein der Cytoplasmamembran ist, wurde durchflusscytometrisch mit Hilfe eines Phycoerythrin-markierten anti-CD82-Antikörpers nach einem Protokoll von Diaclone (Besançon, Frankreich) ermittelt. Hierzu wurden die Zellen durch Abschaben geerntet, zentrifugiert und auf einheitliche Zellzahlen eingestellt. Dann wurden 50.000 Zellen in 50 µl PBS mit 1 % BSA aufgenommen und mit 1 µl Antikörper versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden 100 µl PBS mit 1 % BSA zugegeben und 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt; das Pellet wurde in 400 µl PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert, in 150 µl PBS aufgenommen und sofort durchflusscytometrisch untersucht. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz un behandelter und mit dem Antikörper behandelter Zellen mit Hilfe einer Histogrammdarstellung der FL2-Messwerte gegenübergestellt.

3.10.2 Anreicherung von Zellen mit starker Expression von CD82

Um Zellen mit hohem CD82-Expressionsniveau aus einer stabil mit CD82 transfizierten Zellpopulation zu isolieren, wurden 10⁷ Zellen – wie in Abschnitt 3.10.1 beschrieben – mit Hilfe eines Phycoerythrin-markierten anti-CD82-Antikörpers markiert und durchflusscytometrisch analysiert. Dabei wurden 5000 besonders stark exprimierende Zellen mit mittlerer Stringenz separiert (FACS-Calibur/CellQuest-Einstellung *exclusion*). Dies entspricht etwa 1 % der Gesamtzellen. Die separierten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen aufgefangen, die zuvor mit 30 %igem FKS geblockt worden waren, um die Anheftung der durch den Sortiervorgang geladenen Zellen an die Röhrchenwand zu vermeiden. Zur Entfernung des gebundenen Phycoerythrin-markierten Antikörpers wurden die separierten Zellen zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert (10 min,

1500 g, 4°C), bevor sie in Medium ohne Selektionsantibiotikum aufgenommen und kultiviert wurden. Nach etwa einer Woche wurde die Selektion wieder aufgenommen, die Zellen wurden weiter vermehrt und vor dem Beginn weiterer Experimente erneut auf ihre CD82-Expression überprüft.

3.11 Bestimmung der Zelladhäsion und -migration

3.11.1 Nachweis der Zelladhäsion an Laminin

Zur Überprüfung des Adhäsionsverhaltens von Zellen an Laminin, das eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix darstellt, wurden *96-well*-Zellkulturplatten mit 1 µg Laminin pro cm² beschichtet. Dazu wurden die Platten am Tag des Adhäsionsversuchs 1,5 h bei 37°C mit 50 µl Laminin-Lösung (100 ng/ml in PBS) pro *well* inkubiert, mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl BSA-Lösung (3 % in PBS) für 1 h bei 37°C gelagert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Danach wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, welches durch Ausklopfen auf sterilen Papiertüchern weitgehend entfernt wurde, und 20 min ohne Deckel bei Raumtemperatur unter der Sterilwerkbank getrocknet.

Während der Inkubationszeiten wurden die zu untersuchenden Zelllinien, die zwei Tage vor Versuchsbeginn in 15 cm-Schalen ausgesät worden waren, bei einer Konfluenz von 50-70 % geerntet. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann bis zur Ablösung in PBS mit 5 mM EDTA und 0,1 % BSA bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (1000 g, 3 min) und zweimal mit DMEM mit 0,2 % BSA gewaschen. Nach Bestimmung der Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld) wurden die verschiedenen Zelllinien und auf eine Zelldichte von 250.000/ml eingestellt.

Für die Überprüfung des Adhäsionsverhaltens wurden 100 µl der Zellsuspension (25.000 Zellen) pro *well* ausgesät und für 30 bis 120 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhären Zellen durch Ausschlagen der Platten auf sterilen Papiertüchern und zweimaliges Waschen mit DMEM mit 0,2 % BSA entfernt. Die verbliebenen, adhären Zellen wurden mit 100 µl DMEM mit 0,2 % BSA versetzt. Die quantitative Auswertung der Adhäsion erfolgte mit Hilfe eines MTT-Tests (vgl. Abschnitt 3.11.3). Um die Werte der verschiedenen Zelllinien untereinander zu vergleichen, wurde parallel ein MTT-Test mit 100 µl der auf 250.000 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension

durchgeführt, dessen Ergebnisse zur Normalisierung der im Adhäsionsversuch ermittelten Werte verwendet wurden.

3.11.2 Nachweis der haptotaktischen Motilität auf Fibronektin

Eine Möglichkeit zum Nachweis der Motilität von Zellen ist die Verwendung sogenannter *transwell*-Einsätze: Diese verfügen über eine Polyethylenterephthalat-Membran, die pro cm² 100.000 Poren mit einem Durchmesser von 8 µm hat (Falcon/Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich). Diese Einsätze werden so in 24-*well*-Zellkulturplatten eingesetzt, dass zwei Kompartimente entstehen: in das obere werden die Zellen ausgesät, im unteren, d.h. an der Unterseite der Membran, können die durch die Poren migrierten Zellen detektiert werden.

Zum Nachweis der haptotaktischen Motilität auf Fibronektin wurde die Unterseite der *transwell*-Membran mit 5 µg Fibronektin pro cm² beschichtet. Hierzu wurde die 0,32 cm² große Membran am Tag des Versuchs mit 10 µl einer Fibronektin-Lösung (300 µg/ml) beschichtet und bei Raumtemperatur unter einer Sterilwerkbank getrocknet.

In der Zwischenzeit wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.11.1 beschrieben geerntet und auf eine Zelldichte von 120.000 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden 250 µl auf die Oberseite eines *transwell*-Einsatzes gegeben, während in das untere Kompartiment 750 µl DMEM mit 0,2 % BSA gegeben wurden. Anschließend wurden die Ansätze je nach Zelllinie 6 bis 30 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor die Zahl der migrierten Zellen bestimmt wurde: Hierzu wurden die Zellen auf den *transwell*-Einsätzen zunächst 10 min mit Methanol fixiert und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt, indem die Einsätze für 15 min in einer Kristallviolett-Lösung (0,27 g in 30 ml Methanol und 30 ml H₂O) inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die nicht-migrierten Zellen, die sich immer noch auf der Oberseite des *transwell*-Einsatzes befanden, mit einem Wattestäbchen entfernt, so dass die migrierten Zellen, die sich auf der Unterseite des *transwell*-Einsatzes befinden, ausgezählt werden konnten. Zur Kontrolle der Spezifität der Migration wurden auch Zellen auf unbeschichteten *transwell*-Einsätzen ausgesät, wobei allerdings – gemäß den Erwartungen – in keinem Fall eine Migration zu beobachten war.

Um sicher zu stellen, dass in den verschiedenen Ansätzen mit den verschiedenen Zelllinien gleich viele Zellen eingesetzt wurden, was eine Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Ergebnisse ist, wurde, wie in Abschnitt 3.11.1 beschrieben, ein MTT-Test mit 250 µl der verwendeten Zellsuspensionen durchgeführt.

3.11.3 MTT-Test zur Zellzahlbestimmung

Da die Enzymaktivität einer Zelllinie mit der Zellzahl in einem Ansatz ansteigt, ist es möglich, die relative Anzahl an Zellen mit Hilfe eines Enzymtests zu ermitteln. Hierfür wurde der sogenannte MTT-Test verwendet, der auf der Reduktion des Farbstoffs 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen basiert. Das dabei entstehende Formazanblau kann spektrophotometrisch nachgewiesen werden (Hansen et al., 1989). Für den Test wurden 100 µl Zellsuspension mit 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) versetzt und für 3 bis 5 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Der dabei entstehende blaue Farbstoff wurde mit Isopropanol aufgelöst (100 µl Isopropanol mit 4 % 1N HCl zur Entfärbung des im Medium enthaltenen Phenolrots) und mit Hilfe eines ELISA-Plattenlesers quantifiziert (Dynatech MR7000, Testfilter 590 nm; Referenzfilter 750 nm).

4 Ergebnisse

4.1 Screening nach dominant Apoptose-induzierenden Genen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein „Screening“, eine Reihenuntersuchung, nach dominanten Apoptose-induzierenden Genen durchgeführt. Hierzu wurden im 96-*well*-Format einzelne cDNA-Klone einer normalisierten Mausnieren-cDNA-Bank isoliert und im 24-*well*-Format in humane embryonale Nierenzellen (293T) transfiziert. Mikroskopisch wurde die Ausbildung eines typischen apoptotischen Phänotyps (schrumpfende, stärker lichtbrechende Zellen, Bildung apoptotischer Körperchen) 20 bis 50 h nach Transfektion untersucht. Als Positivkontrollen wurden bekannte Apoptoseinduzierer wie Caspase-2 (Nedd2) oder RIP, eine Komponente des TNF-Rezeptorkomplexes, verwendet; als Negativkontrollen dienten Luciferase, β -Galactosidase bzw. die zahlreichen nicht-positiven Klone.

Insgesamt wurden im Verlauf dieser Arbeit etwa 7900 unabhängige cDNA-Klone getestet. Nach Vereinzelung und wiederholter Transfektion erwiesen sich 52 Klone als positiv, was einem Anteil von 0,66 % entspricht. Die Länge der entsprechenden cDNAs variierte zwischen ca. 0,6 und 2,5 kb und betrug im Durchschnitt 1,3 kb.

Die positiven Klone wurden sequenziert und mit Datenbanken abgeglichen (z.B. www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Tabelle 4.1, Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 geben einen Überblick über die erhaltenen positiven Klone. Nur wenige Klone, z.B. die Adenin-Nukleotid-Translokase-1 (Ant1) oder der Parathyroidhormon-/Parathyroidhormon-verwandte Peptidrezeptor, wurden mehrfach isoliert. Die zunächst phänotypisch detektierte Apoptose wurde bei besonders interessanten Klonen durch verschiedene Testverfahren verifiziert, beispielsweise durch Nachweis des Apoptose-typischen DNA-Abbaus (DNA-Leiter-Nachweis oder durchflusscytometrischer Nachweis der Sub-G1-DNA), durch Nachweis der Phosphatidylserinexposition oder durch Nachweis der Spaltung des Caspase-Substrates Poly-(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase (PARP). Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über die dabei erhaltenen Ergebnisse. Außerdem wurde die Apoptoseinduktion in HeLa und HeLa ρ -Zellen getestet. Letztere verfügen über keine intakte mitochondriale Atmungskette und können daher dort keine proapoptotischen Sauerstoffintermediate bilden (Chandel und Schumacker, 1999). Der Vergleich der Apoptoseinduktion in den beiden Zelllinien liefert somit Hinweise auf den Mechanismus der Apoptoseinduktion. Außerdem wurden einige Klone auf ihre Fähigkeit getestet, Apoptose in den untransformierten Rat1-Zellen zu

induzieren. Das Ausbleiben von Apoptose in dieser Zelllinie wäre somit ein Indiz für eine mögliche tumorzellspezifische Apoptoseinduktion, die ein wichtiges Kriterium für die Auswahl eines Klons zur weiteren Charakterisierung sein könnte. Allerdings induzierten alle getesteten Klone Apoptose in Rat1-Zellen, d.h. sie waren in ihrer Wirkung nicht tumorzell-spezifisch.

Die isolierten positiven Klone wurden unterteilt in bereits bekannte Apoptoseinduzierer (Positivkontrollen) und bislang unbekannte Apoptoseinduzierer. Diese gliedern sich in zwei Gruppen von Genen: erstens bereits bekannte Gene und zweitens eine Gruppe mit bislang unbekanntem Sequenzen. Alle drei Gruppen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

4.1.1 Bekannte Apoptoseinduzierer (Positivkontrollen)

Die im Screening isolierten bereits bekannten Apoptoseinduzierer sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Das Aufspüren dieser schon in der Literatur beschriebenen Apoptoseinduzierer spricht für die Eignung der Methode zur Suche nach dominanten Apoptoseinduzierern. Gefunden wurden die Zelltod-induzierenden DFF45-ähnlichen Effektoren CIDE-A und -B, die eine Homologie zum DNA-Fragmentierungsfaktor DFF 45 aufweisen, der durch Caspase-3 aktiviert wird. Sie sind als Apoptoseinduzierer bereits charakterisiert (Inohara et al., 1998). Ebenfalls bekannte physiologische Apoptoseinduzierer sind das Bcl-2 bindende NIP-3 (Chen et al., 1999) und das zum TNF- und Fas-Rezeptorkomplex gehörende FADD (Hsu et al., 1996b), die wie CIDE-B im Rahmen des Screenings von anderen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts gefunden wurden.

4.1.2 Als proapoptotisch identifizierte bekannte Gene

Insgesamt wurden 34 bereits bekannte Gene als proapoptotisch isoliert. Grundsätzlich kann die beobachtete Apoptoseinduktion sowohl für die normale Entwicklung und Funktion des Organismus als auch in Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten von Bedeutung sein.

Bei 14 von diesen Klonen könnte die neu detektierte proapoptotische Aktivität – nach dem gegenwärtigen Stand der Literatur – zur Entstehung von Krankheiten beitragen, mit denen diese Gene in Verbindung gebracht werden. Diese Klone sind im unteren Teil von Tabelle 4.1 zusammengefasst und werden im Folgenden besprochen. Für die übrigen 20 Klone, die in Tabelle 4.2 aufgelistet sind, konnte bislang in der Literatur kein Zusammenhang zwischen ihrer Funktion und der neu entdeckten proapoptotischen Fähigkeit gefunden werden.

Tabelle 4.1 Apoptose-induzierende Klone I

Übersicht über die isolierten dominant Apoptose-induzierenden Klone, die bereits in der Literatur in Zusammenhang mit Zelltod beschrieben sind, sowie über neu als Apoptoseinduzierer identifizierte bekannte Gene, die möglicherweise – aufgrund von Literaturerecherchen – zur Entstehung bestimmter Krankheiten beitragen könnten. Die drei mit * markierten Klone wurden von anderen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts isoliert. Die angegebene Genbank-Zugangsnummer bezeichnet den Eintrag der NCBI-Datenbank, der die größte Übereinstimmung mit dem sequenzierten Klon aufwies.

Klon	Genbank-Zugangsnummer	Klonbeschreibung
<u>Bekannte Apoptoseinduzierer („Positivkontrollen“)</u>		
#40	AF041376	Zelltod-induzierender DFF45-ähnlicher Effektor A (CIDE-A)
*	AF041377	Zelltod-induzierender DFF45-ähnlicher Effektor B (CIDE-B)
*	AF041054	NIP-3
*	U43184	FADD
<u>Als proapoptotisch identifizierte bekannte Gene mit möglicher Krankheitsassoziation</u>		
#2	U27315	Adenin-Nukleotid-Translokase-1 (Ant1)
#5	X78936	Parathyroidhormon- / Parathyroidhormon-verwandter Peptidrezeptor (PTHrR/PTHrR)
#7	NM_0088218	Hämoglobin- α , adulte Kette 1 (Hba-a1)
#8	AF176007 AF189389	Mitochondriales Transporter Homolog 1 Isoform a (MTCH) Presenilin-assoziiertes Protein
#34	S74803	Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase Komplex II, Membran-intrinsische Untereinheit (CII-3)
#36	AF056031	Kynurenin 3-monooxygenase
#45	AF061026	<i>Leucin-zipper-EF-hand</i> enthaltendes Transmembranprotein 1 (Letm1)
#50	AB006202	Cytochrom b kleine Untereinheit von Komplex II
#48	D14883	C33/R2/IA4, Metastasensuppressor
#53	U76253	E25B
#60	M76131	Elongationsfaktor 2 (EF-2)
#66	X76453	H-rev107
#71	U00677	Syntrophin-1
#73	U30838	Spannungsabhängiger Anionenkanal-2 (<i>Voltage dependent anion channel-2</i> , VDAC)

Ein Beispiel für ein Protein dieser Gruppe ist die Adenin-Nukleotid-Translokase-1 (Ant1). Sie ist Teil der mitochondrialen PT-Pore, die bei der mitochondrialen Apoptoseinduktion eine Rolle spielt (vergleiche Abschnitt 1.2.2) und vermag dominant Apoptose zu induzieren (Bauer et al., 1999). Physiologisch relevant sein könnte die Ant1-Apoptose bei der Herzmuskelschwäche DCM (*dilated cardiomyopathie*), bei der eine erhöhte Apoptoserate beobachtet wurde (Dorner et al., 1997; Schultheiss et al., 1996). Wie Ant1 ist auch der spannungsabhängige Anionenkanal-2 (VDAC) eine Komponente der mitochondrialen PT-Pore (Zoratti und Szabo, 1995). Er kann nach UV-Bestrahlung hochreguliert werden und könnte zur UV-induzierten Apoptose beitragen (Voehringer et al., 2000).

Die im Screening detektierte, durch den Parathyroidhormon (verwandten) Peptidrezeptor (PTHr/PTHrR) induzierte Apoptose wurde mittlerweile auch in der Literatur beschrieben. Sie erfolgt vermutlich durch die Aktivierung von Phospholipase C und Veränderungen im Ca^{2+} -Spiegel, ausgelöst durch den G-Protein gekoppelten Hormonrezeptor. Die physiologische Bedeutung der Apoptoseinduktion ist jedoch derzeit noch unklar, zumal der PTHr/PTHrR je nach zellulärem Kontext auch in antiapoptotische Signalwege involviert sein kann; eine Rolle als pathologischer Apoptoseinduzierer ist jedoch nicht auszuschließen (Turner et al., 2000).

Die Apoptoseinduktion durch Hämoglobin α könnte bei bestimmten β -Thalassämien relevant sein, bei denen ein Überschuss an Hämoglobin α für den Zelltod in Knochenmarkzellen verantwortlich gemacht wird (Schrier, 1997; Scott et al., 1993).

Die Entdeckung einer proapoptotischen Wirkung des Elongationsfaktors EF-2 war zunächst überraschend. Allerdings demonstrierten bereits Morimoto und Bonavida, dass EF-2 eine Rolle bei der durch Bakterientoxine (Diphtherietoxin und *Pseudomonas A-Toxin*) induzierten Apoptose spielt (Morimoto und Bonavida, 1992).

Des Weiteren wurden drei Klone identifiziert, die in Zusammenhang mit neurodegenerativen Krankheiten stehen, bei denen Apoptose bekanntermaßen eine Rolle spielt: Der erste, ein Klon, der Homologien zum Presenilin-assoziierten Protein aufweist, könnte seine proapoptotische Wirkung möglicherweise durch die Interaktion mit Presenilinen, deren mutierte Formen in Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion bei Alzheimer gebracht werden, entfalten (Czech et al., 2000; Van Gassen et al., 2000). Das ebenfalls isolierte E25B ist das Maus-Homolog des humanen Proteins Bri, dessen durch Punktmutation des Stop-Codons verlängerte Variante aBri die familiäre britische Demenz hervorruft: eine Alzheimer-ähnliche autosomal-dominante neurodegenerative Krankheit. aBri kann oligomerisieren, Amyloid-artige Fibrillen bilden und im Gegensatz zum Wildtypprotein Apop-

tose induzieren (El-Agnaf et al., 2001). Der dritte Klon, die Kynurenin-3-monooxygenase ist ein Enzym des Tryptophanstoffwechsels und katalysiert die Synthese von 3-Hydroxykynurenin, welches in bestimmten Gehirnregionen von Huntington-Patienten angereichert ist (Pearson und Reynolds, 1992). Auch in Zusammenhang mit HIV-assoziiierter Demenz werden erhöhte Konzentrationen des Neurotoxins beobachtet (Sardar et al., 1995). Die proapoptotische Wirkung von transfizierter Kynurenin-3-monooxygenase ist möglicherweise wie die bereits publizierte Wirkung von 3-Hydroxykynurenin auf die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate zurückzuführen (Okuda et al., 1996; Okuda et al., 1998).

In diese Gruppe fallen auch zwei Gene, die mit muskulären Veränderungen in Verbindung gebracht werden: Letm 1 und Syntrophin-1. Letm 1, ist ein Transmembranprotein, das neben wenigen anderen auf Chromosom 4 gelegenen Genen bei den meisten Patienten mit Wolff-Hirschhorn-Syndrom deletiert ist. Zum Krankheitsbild der erbten Krankheit, die mit einer Inzidenz von 1:50.000 auftritt und zu dem die Letm1-Deletion beiträgt, gehören neuromuskuläre Veränderungen sowie schwere mentale und entwicklungsbezogene Schädigungen (Endele et al., 1999; Rauch et al., 2001). Das Auftreten apoptotischer Zellen wurde allerdings in Zusammenhang mit dem Wolff-Hirschhorn-Syndrom bislang nicht beschrieben. Auch Syntrophin-1 wurde bisher noch nicht in Zusammenhang mit Apoptose gebracht. Es ist ein Adapterprotein im Dystrophin-Glykoproteinkomplex, der eine Rolle bei zahlreichen Muskeldystrophien spielt. Es interagiert mit Grb2, einem Wachstumsfaktorrezeptor-gekoppelten Adapterprotein (Oak et al., 2001), mit Stress-aktivierter Kinase SAPK3/ERK6 (Hasegawa et al., 1999) und vermag darüber hinaus Ca^{2+} und Calmodulin zu binden (Newbell et al., 1997).

Weiterhin wurden drei Klone als proapoptotisch identifiziert, die als Tumor- oder Metastasensuppressoren bekannt sind: CII-3, H-rev 107 und C33. In Abschnitt 1.4.1 wurde die kritische Rolle der Apoptose bei der Tumorbildung und Metastasierung bereits ausführlich dargelegt. Somit könnte die Apoptoseinduktion durch die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase Komplex II-Untereinheit (CII-3) ein Grund dafür sein, warum diese in Tumoren transkriptionell herabreguliert ist und als Tumorsuppressor eingestuft wird (Baysal et al., 2000; Niemann und Muller, 2000). Ähnliches könnte für das isolierte Cytochrom b gelten. Die Apoptoseinduktion durch CII-3 wurde bereits im Rahmen einer Doktorarbeit untersucht, wobei sich herausstellte, dass der vollständige Komplex II für die Apoptoseinduktion durch verschiedene Chemotherapeutika essentiell ist (Albayrak 2001). H-rev 107 ist ein Tumorsuppressor unbekannter Funktion, der in zahlreichen Tumoren sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene herabreguliert ist (Husmann et

al., 1998). Das Gen wurde bislang nicht als proapoptotisch beschrieben, doch führt die Überexpression von H-rev 107 in H-ras-transformierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Tumorigenität in Nacktmäusen. In Zellen, die den dennoch gebildeten Tumoren entnommen wurden, konnte das H-rev 107-Protein nicht mehr nachgewiesen werden (Sers et al., 1997). Dies deutet auf eine starke Selektion gegen die Expression von H-rev 107 hin, die durch die in dieser Arbeit entdeckte proapoptotische Fähigkeit des Proteins erklärt werden könnte. Dass H-rev 107 zwar in HeLa-, nicht aber in HeLa- ρ 0-Zellen, Apoptose induziert (vgl. Tabelle 4.4), ist ein Hinweis darauf, dass für die Apoptoseinduktion eine intakte mitochondriale Elektronentransportkette erforderlich ist. Das Dritte dieser neu als proapoptotisch identifizierten Tumor- und Metastasensuppressorgene ist C33. Seine Fähigkeit, die Bildung von Metastasen zu supprimieren, macht es zu einem interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen. Daher wurde es im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert (siehe Kapitel 4.2 ff.).

Zu den 20 Apoptose-induzierenden Klonen, die bislang nicht mit bestimmten Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden können (vgl. Tabelle 4.2), gehören Transportproteine (z.B. die innere mitochondriale Membrantranslokase Tim23), Komponenten des Fettsäurestoffwechsels (z.B. die *Very-long-chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase* und die *Medium chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase*) und Proteine des Kohlenhydratstoffwechsels (das putative Glykogen-Speicherkrankheit Typ1-Protein); außerdem das Cytochrom β 558 und die L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase.

Weitere Mitglieder dieser Untergruppe sind zwei Proteine, die nahezu uncharakterisiert sind: Shyc und das synaptische Glykoprotein. Shyc wird in Neuronen exprimiert. Seine Funktion ist noch völlig ungeklärt, zumal es keinerlei signifikante Homologie zu anderen Proteinen aufweist (Koster et al., 1998). Über das zweite Protein, das synaptische Glykoprotein, ist nichts bekannt, außer dass es eine Homologie zur 5-a-Reduktase aufweist, einem mikrosomalen Membranprotein, das eine Rolle im Testosteronstoffwechsel spielt (Johnston et al., 1992).

Ein weiteres Protein, dessen Apoptose-induzierende Fähigkeit detektiert wurde, ist ein Fragment der Serin-Threonin-Proteinkinase 51PK. Welche Funktion die Kinase in der Zelle innehat, ist bislang noch nicht geklärt. Es ist lediglich bekannt, dass das 51 kDa große Protein, von dem zwei Spleissvarianten beschrieben sind, im Kern lokalisiert ist und über eine Kinase-Aktivität verfügt (Zelko et al., 1998).

Tabelle 4.2 Apoptose-induzierende Klone II

Übersicht über weitere isolierte dominant Apoptose-induzierende Klone, deren zelluläre Funktion bekannt ist. Die angegebene Genbank-Zugangsnummer bezeichnet den Eintrag der NCBI-Datenbank, der die größte Übereinstimmung mit dem sequenzierten Klon aufwies.

Klon	Genbank-Zugangsnummer	Klonbeschreibung
Weitere als proapoptotisch identifizierte bekannte Gene		
#6	AJ272046	Calciumkanal-gamma 5 Untereinheit (CACNG5)
#13	NM_012504	Na ⁺ K ⁺ -transportierende ATPase, alpha 1 Polypeptid (Atp1a1)
#18	AJ223958	<i>Very-long-chain</i> Acyl-CoA-Synthetase (VLACS)
#33	AF080469	Putatives Glykogen-Speicherkrankheit Typ 1b-Protein
#39	AB005451	Nieren-spezifischer Transporter (RST)
#43	M12673	Guanin-Nukleotid-Bindeprotein G-s, alpha Untereinheit
#47	U22465	Na/Pi-Cotransporter (NaPi-7)
#51	M31775	Cytochrom beta-558
#59	U07159	<i>Medium-chain</i> Acyl-CoA-Dehydrogenase
#61	AF072757	Fettsäuretransportprotein 2
#69	S45663	Synaptisches Glykoprotein (SC2)
#74	U53456	Proteinphosphatase-1 γ (PP1c γ)
#75	U52842	Nieren-spezifisches Transportprotein
#77	AF080252	Serin-Threonin-Proteinkinase- 51PK
	AB000449	VRK1
#78	J04806	Osteopontin
#81	AB006451	Innere mitochondriale Membrantranslokase Tim23
#86	AF072697	Shyc
#87	U07971	L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase
#91	S77924	Glucose-Transporter Isoform 1 (Glut-1)
#92	AJ010953	Putative Ca ²⁺ -transportierende ATPase

Des Weiteren wurde ein Klon mit Homologie zu dem Guanin-Nukleotid-Bindeprotein G-s identifiziert. Dieses ist notwendig für Hormon-stimulierte cAMP-Bildung; seine verminderte Aktivität führt zur erblichen Albright-Osteodystrophie, da die Zellen auf Hormon-stimulation (z.B. durch Parathyroidhormon) nicht mehr mit Stimulation der Adenylat-Cyclase reagieren können (Namnoum et al., 1998). Außerdem ist das Protein ein negativer Regulator von Insulin-mediierten Effekten (Yu et al., 2001) und stimuliert die Proliferation,

Invasivität und die *in vivo*-Tumorigenität von Prostatakrebszellen (Chien und Shah, 2001; Chien et al., 1999). Eine Funktion als Apoptoseinduzierer wurde bislang nicht beschrieben. Ebenfalls als Apoptoseinduzierer identifiziert wurde die katalytische γ -Untereinheit der Proteinphosphatase 1c. Es existieren verschiedene Isoformen der Phosphatase, von denen wenigstens eine für die Spermatogenese essentiell ist. Ist sie deletiert, beobachtet man Probleme bei der Meiose und eine deutliche DNA-Degradation (Jurisicova et al., 1999; Varmuza et al., 1999). Dies legt den Schluss nahe, dass die verschiedenen Isoformen der Proteinphosphatase zur Apoptoseregulation beitragen.

Ein weiterer als proapoptotisch isolierter Klon ist Osteopontin, ein sekretiertes phosphoryliertes Glykoprotein, das in allen Körperflüssigkeiten und der Matrix mineralisierter Gewebe zu finden ist. Es dient sowohl als Cytokin als auch als Adhäsionsprotein und interagiert mit verschiedenen Integrinen und dem Metastasensuppressor CD44 (Denhardt et al., 2001). Im Gegensatz zu diesem ist Osteopontin jedoch in Tumoren und Metastasen hochreguliert und ihm wird – in Übereinstimmung damit – eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben (Noti, 2000; Weintraub et al., 2000). Darüber hinaus fördert Osteopontin die Migration von Zellen und spielt eine Rolle bei der Knochenbildung und der Zell-vermittelten Immunität (Denhardt et al., 2001). Möglicherweise verhält sich das Protein abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext pro- oder antiapoptotisch. Möglich ist auch, dass es sich bei dem in dieser Arbeit als proapoptotisch beschriebenen Klon um eine Spleisvariante handelt, da der Klon nur vom 5'- und vom 3'-Ende her ansequenziert wurde.

4.1.3 Uncharakterisierte Apoptose-induzierende Sequenzen

Darüber hinaus wurden zahlreiche Klone isoliert, die keine Homologie zu bekannten Genen aufweisen und die lediglich eine Homologie zu in der Datenbank aufgeführten ESTs (*expressed sequence tags*) zeigen. Sie sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Bereits untersucht wurde cgi-135 (Klon Nr. 9), das auch von T. Albayrak, einem anderen Mitarbeiter des MPI für Biochemie, im Screening isoliert und im Rahmen seiner Doktorarbeit charakterisiert wurde. Es wird auch als Saip (*small apoptosis inducing protein*) bezeichnet und ist ein evolutionär konservierter, im ER lokalisierter Apoptoseinduzierer, der durch Bap31, welches auch mit Bcl-x_L interagiert, gehemmt werden kann. Außerdem wird Saip-Apoptose durch das kleine Glutamin-reiche Tetratricopeptid SGT, welches mit Parvovirusproteinen interagiert, inhibiert. Daher könnte SAIP möglicherweise eine Rolle bei der Apoptoseregulation im Verlauf von Parvovirus-Infektionen spielen (Albayrak 2001).

Weitere als proapoptotisch identifizierte Klone, deren Apoptoseinduktion durch weitere Experimente bestätigt wurde (vgl. Tabelle 4.4), sind die Klone Nr. 9, Nr. 35 (MTDCF), Nr. 38 und Nr. 57. Klon Nr. 38 weist eine Homologie zu einem Endonuklease-ähnlichen EST auf, allerdings nicht in der eigentlichen Endonuklease-Region.

Tabelle 4.3 Apoptose-induzierende Klone III

Übersicht über die isolierten dominant Apoptose-induzierenden Klone, deren zelluläre Funktion bislang unbekannt ist. Die angegebene Genbank-Zugangsnummer bezeichnet den Eintrag der NCBI-Datenbank, der die größte Übereinstimmung mit dem sequenzierten Klon aufwies.

Klon	Genbank-Zugangsnummer	Klonbeschreibung
<u>Uncharakterisierte Apoptose-induzierende Sequenzen</u>		
<u>(mit signifikanter Homologie zu ESTs)</u>		
#1	AA986577	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon
#3	AK000632	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ20625 fis
#9	AF151893	<i>Homo sapiens</i> CGI-135-Protein mRNA
#20	AL080066	<i>Homo sapiens</i> cDNA DKFZp564J142
#30	AF216754	<i>Homo sapiens</i> überexprimierte Brusttumorprotein (OBTP)mRNA
#32	AF151807	<i>Homo sapiens</i> CGI-49-Protein mRNA
#35	AF116911	<i>Mus musculus</i> thymic dendritic cell derived factor 1 (MTDCF)
#38	AW109849 AA277327 AI646762	<i>Mus musculus</i> -Leber (dioxin-behandelt) cDNA-Klon MT2475 <i>Mus musculus</i> cDNA-Klon, ähnlich CE00039 GTP-Bindeprotein <i>Mus musculus</i> cDNA-Klon, ähnlich CE08662 Endonuclease
#46	AA086895	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon 493346
#56	AW489000	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon
#57	AI115883	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon 1498942, homolog zum Protein-phosphatase-1 bindenden Protein
#58	AI315450	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon
#67	AW107362	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon, ähnlich zur humanem P45381 Aspartoacylase
#68	AI315920 AF110520	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon, ähnlich GIANT LARVAE-Homolog <i>Mus musculus</i> MHC-Region, die u.a. das Fas-Bindeprotein beinhaltet
#70	AA763399	<i>Mus musculus</i> cDNA, ähnlich zur Lactat-Dehydrogenase
#72	AA109006	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon, ähnlich CE01489 Transportprotein
#88	AU035342	<i>Mus musculus</i> cDNA-Klon MNCb-0343

Tabelle 4.4 Nachweis der Apoptoseinduktion ausgewählter Klone

Getestet wurden DNA-Degradation (elektrophoretischer Nachweis einer DNA-Leiter oder durchflusscytometrischer Nachweis von Sub-G1-DNA), Exposition von Phosphatidylserin (PS, mikroskopische Analyse Annexin-GFP-gefärbter Zellen) und PARP-Spaltung (Western-Blot) nach Transfektion in 293T-Zellen (lediglich der PARP-Western-Blot von C33 wurde mit HeLa-Zellextrakten durchgeführt). Ferner wurde die Ausbildung eines apoptotischen Phänotyps in HeLa-Zellen mit und ohne funktioneller Atmungskette (ρ^+ - bzw. ρ^0 -Zellen) sowie in untransformierten Rat1-Zellen überprüft. Mit + sind positive Ergebnisse, mit - negative Ergebnisse bezeichnet; n.d. bedeutet, dass das entsprechende Experiment nicht durchgeführt wurde.

Klon	Klon-bezeichnung	DNA-Leiter (293T)	Sub-G1-DNA (293T)	PS-Exposition (293T)	PARP-Spaltung (293T oder HeLa)	Phänotyp in HeLa ρ^+ & ρ^0	Phänotyp in Rat 1
#7	Hämoglobin alpha (Hba-a1)	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#8	Mitoch. Transporter Homolog / Presenilin assoziiertes Protein	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
#9	EST	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#22	Parathyroidhormon (verwandter) Peptidrezeptor (PTHrR/PTHrR)	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#35	Maus <i>thymic dendritic cell derived factor</i> (MTDCF)	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	+
#36	Kynurenin 3-hydroxylase	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
#38	EST	+	+	+	+	n.d.	+
#39	Nieren-spezifischer Transporter (RST)	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#40	Zelltod-induzierender DFF45-artiger Effektor A (CIDE-A)	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#45	Letm1	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#48	C33	n.d.	+	+	+	+/+	n.d.
#53	E25B	+	+	+	+	n.d.	n.d.
#57	EST	+	+	n.d.	n.d.	+/+	n.d.
#66	H-rev107	n.d.	+	+	+	+/-	n.d.
#71	Syntrophin-1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+
#73	VDAC	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#77	Ser/Thr-Kinase 51PK	+	+	+	+	+/+	+
#78	Osteopontin	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
#86	Shyc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+

4.1.4 Auswahl des Metastasensuppressorgens C33 für weitere Untersuchungen

Aus den im Screening erhaltenen positiven Klonen wurde das Metastasensuppressorgen C33 aufgrund seiner besonderen Eigenschaften für weitere Untersuchungen ausgewählt: C33, bzw. sein humanes Homolog CD82/KAI1, ist ein Protein, dessen Expression in Metastasen und vielen stark metastasierenden Tumoren herabreguliert ist. Die Re-Expression von C33/CD82 in C33/CD82-defizienten Zelllinien führt dementsprechend auch zu einer mehr als 50 %igen Reduktion des Metastasierungspotentials von Brustkrebs- und Melanomzellen in Nacktmäusen (vgl. Abschnitt 1.5.1). Die Ursache für diese starke *in vivo*-Wirkung des Proteins ist noch nicht bekannt. Bislang publizierte, *in vitro* durchgeführte Experimente zeigen, dass C33/CD82 eine Rolle bei der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix-Interaktionen spielt und die Internalisierung des EGF-Rezeptors beschleunigt (vgl. Abschnitt 1.5.3). Beide Eigenschaften könnten theoretisch die metastasierungssupprimierende Wirkung des Proteins bedingen, aber ebenso könnte auch die in dieser Arbeit entdeckte Apoptoseinduktion wesentlich zur *in vivo* beobachteten Metastasensuppression beitragen, zumal die Apoptoseinduktion ein kritischer Faktor in verschiedenen Phasen der Metastasierung ist (vgl. Abschnitt 1.4.1). Daher sollte der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch C33 und dessen mögliche Relevanz für die Metastasierung im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die beim Screening detektierte Abrundung und Apoptose-typische Zunahme der Lichtbrechung der mit C33 transfizierten 293T-Zellen ist in Abbildung 4.1A dokumentiert. Um zu überprüfen, ob der beobachtete Phänotyp durch das C33-Protein und nicht z.B. durch eine *antisense*-Wirkung der C33-mRNA hervorgerufen wird, wurde ein Expressionsplasmid für C33 mit deletiertem Start-Codon hergestellt und in die Zellen transfiziert. Da dabei keinerlei phänotypischen Veränderungen zu beobachten waren (vgl. Abbildung 4.1B), ist davon auszugehen, dass die proapoptotische Wirkung durch das C33-Protein und nicht durch die C33-mRNA bedingt ist.

Bemerkenswert ist, dass die Transfektion von C33 in 293T-Zellen zwar zu einer deutlichen Phänotypveränderung, nicht aber zur Bildung der charakteristischen apoptotischen Körperchen führte (Abbildung 4.1). Um sicherzustellen, dass es sich bei dem durch C33 bedingten Effekt tatsächlich um Apoptose handelt, wurden weitere Vortests durchgeführt: Hierzu wurden HeLa-Zellen transfiziert. Diese zeigten alle phänotypischen Charakteristika apoptotischer Zellen, inklusive der Bildung apoptotischer Körperchen. Darüber hinaus

wurde die Apoptose-typische DNA-Degradation in 293T- und HeLa-Zellen (durchflusscytometrischer Nachweis der Sub-G1-DNA), die Exposition von Phosphatidylserin in 293T-Zellen und Spaltung des Caspase-Substrates PARP in HeLa-Zellen nachgewiesen, die alle als typische Merkmale der Apoptose gelten (vgl. Tabelle 4.4 und Abschnitt 4.2.1). Aufgrund dessen konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem durch C33-Transfektion induzierten Effekt um Apoptose handelt, die sich in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich manifestiert.

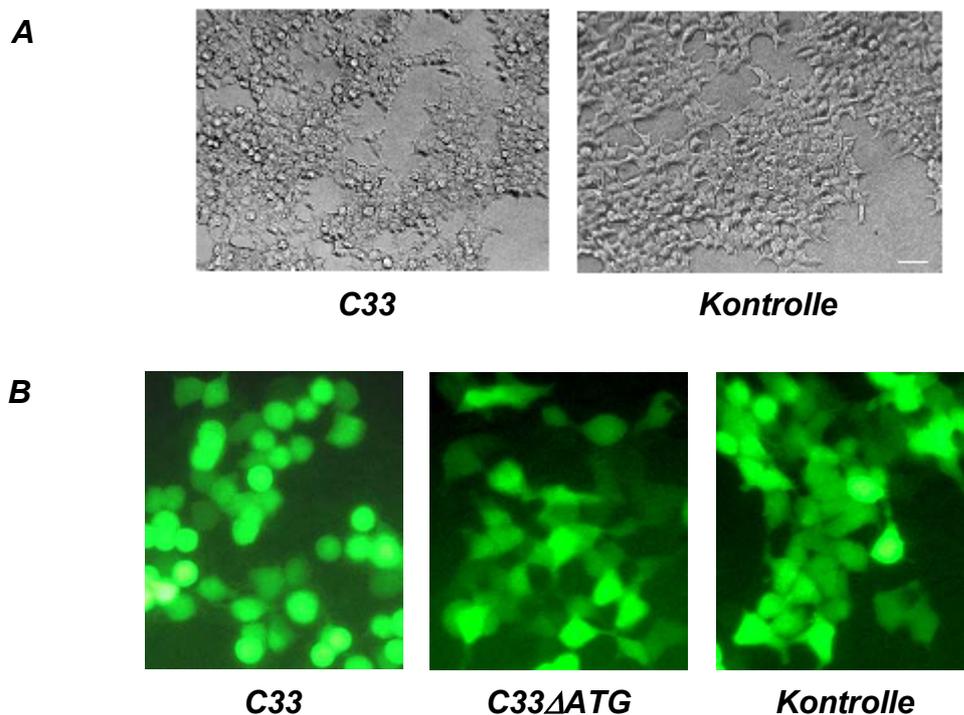


Abbildung 4.1 Phänotypischer Vergleich von C33- und kontrolltransfizierten 293T-Zellen

(A) Die mit C33 transfizierten Zellen zeigen im Vergleich zu den Luciferase-transfizierten Kontrollzellen im Phasenkontrast eine deutliche Abrundung und Apoptose-typische Zunahme der Lichtbrechung. Die Zellen wurden durch Calcium-Phosphat-Copräzipitation mit 3 μg Expressionsplasmid (für C33 bzw. Luciferase) sowie 1 μg EGFP-Vektor als Transfektionskontrolle im 12-*well*-Format transfiziert. Die Photos wurden im Phasenkontrast 40 h nach Transfektion aufgenommen. Die Länge des Balkens entspricht dabei 100 μm . **(B)** Auch im Fluoreszenzlicht erkennt man die Abrundung bei C33-transfizierten Zellen, ganz im Gegensatz zu den Zellen, die mit ATG-deletiertem C33 transfiziert wurden, die ebenso wie die mit pcDNA3 Δ -transfizierten Kontrollzellen keinerlei Auffälligkeiten zeigen. Dies demonstriert, dass der durch C33-Transfektion erzeugte Phänotyp auf die Wirkung des C33-Proteins und nicht auf die Wirkung der mRNA (z.B. *antisense*-Effekte) zurückzuführen ist. Die Zellen wurden mit 5 μg Expressionsplasmid (pC33, pC33 Δ ATG bzw. pcDNA3 Δ) sowie 2 μg pEGFP im 12-*well*-Format transfiziert und 24 h nach Transfektion mit 320-facher Vergrößerung photographiert.

4.2 Charakterisierung der proapoptotischen Aktivität von C33/CD82

4.2.1 C33/CD82-Apoptose wird durch Caspasen vermittelt

Wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, sind Caspasen die zentralen Mediatoren der Apoptose. Allerdings gibt es in der Literatur eine steigende Zahl von Beispielen, die zeigen, dass einzelne Charakteristika der Apoptose, wie das Schrumpfen der Zellen, die Bildung apoptotischer Körperchen oder die Kondensation des Zellkerns, auch ohne Beteiligung von Caspasen herbeigeführt werden können (Borner und Monney, 1999; Xiang et al., 1996). Beispielsweise induzieren die TNF-Rezeptor-assoziierte Protease Cathepsin B sowie die DFF45-ähnlichen Effektoren CIDE-A und -B auch in der Gegenwart von Pan-Caspase-inhibitoren Apoptose (Foghsgaard et al., 2001; Inohara et al., 1998). Auch Mechanismen, die zur Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors AIF führen, können Caspase-unabhängig Apoptose induzieren (Jozsa et al., 2001; Susin et al., 2000).

Um die Beteiligung von Caspasen an der C33-induzierten Apoptose zu testen wurde C33 mit dem Caspaseinhibitor p35 in 293T-Zellen coexprimiert. Dieser aus Baculoviren stammende Caspaseinhibitor verfügt über ein breites Wirkungsspektrum und verhindert sowohl Rezeptor-vermittelte als auch durch Aktivierung der Mitochondrien vermittelte Apoptose, sofern sie durch Caspasen initiiert ist (Bump et al., 1995; Strasser et al., 2000; Thornberry und Lazebnik, 1998). Wie in Abbildung 4.2 A dargestellt, vermindert die Coexpression von p35 die C33-induzierte Apoptose in 293T-Zellen um 50 %. Dies deutet auf eine Beteiligung von Caspasen bei der C33-induzierten Apoptose hin. Ein weiteres Indiz für die Relevanz der Caspasen ist, dass sich C33-Apoptose durch Verwendung des Pan-Caspase-Inhibitors zVAD zu 77 % in HeLa-Zellen bzw. zu 47 % in MCF-7-Zellen reprimieren lässt (vergleiche Abbildung 4.15 B).

Ebenfalls für die Beteiligung von Caspasen sprechen Caspase-abhängige Prozesse, die bei der C33-Apoptose beobachtet wurden: Beispielsweise die Exposition von Phosphatidylserin, die 22 und 28 h nach Transfektion in 293T-Zellen nachgewiesen wurde (vgl. Tabelle 4.4) und die durch Effektor-Caspasen vermittelte Spaltung der Poly-(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase PARP, die in HeLa-Zellen 45 h nach Transfektion mit C33 im Western-Blot demonstriert wurde (Abbildung 4.3 A).

Da viele, aber nicht alle Formen der Apoptose zur Fragmentierung der chromosomalen DNA führen (Fabbretti et al., 1995), wurde das Auftreten dieses Merkmals bei der C33-induzierten Apoptose überprüft: Sowohl in 293T- (Abbildung 4.2 B) als auch in HeLa-

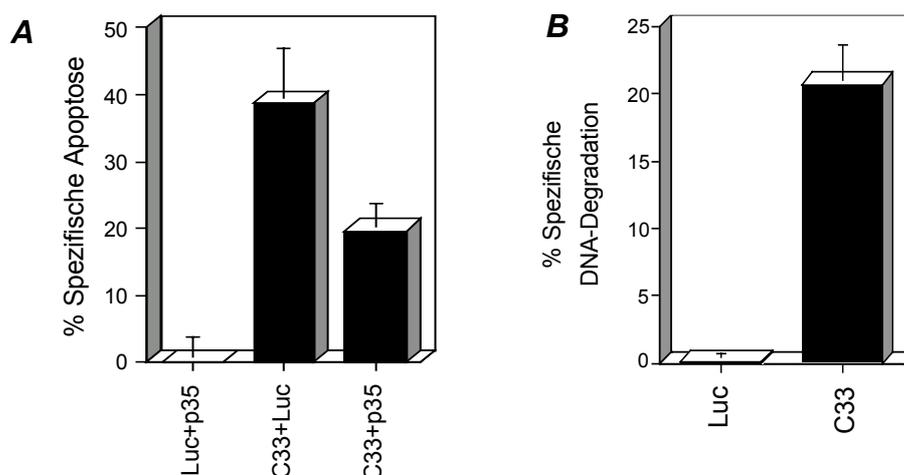


Abbildung 4.2 Inhibition der C33-Apoptose durch p35 und Nachweis der DNA-Degradation in 293T-Zellen

(A) Die Anzahl apoptotischer 293T-Zellen wird durch Cotransfektion des Apoptoseinhibitors p35 um 50 %, von 38,7 auf 19,7 %, reduziert. Hierzu wurden die Zellen mit 0,2 μg Expressionsplasmid für Luciferase bzw. C33, 1 μg Expressionplasmid für p35 bzw. Luciferase und 0,1 μg pEGFP mit der Calciumphosphat-Methode im 12-*well*-Format transfiziert. Nach 22 h wurde im Fluoreszenzlicht der Anteil apoptotischer Zellen bezogen auf alle transfizierten Zellen durch Auszählen ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. (B) Etwa 20 % der mit C33-transfizierten 293T Zellen zeigen 42 h nach Transfektion den für die Apoptose charakteristischen Abbau der chromosomalen DNA. Die Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode mit 2,5 μg Expressionsplasmid (für C33 bzw. Luciferase) und 0,5 μg pEGFP im 12-*well*-Format transfiziert. Der Anteil an Zellkernen mit degradiertem DNA (Sub-G1-DNA) wurde durchflusscytometrisch bestimmt. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP ebenfalls durchflusscytometrisch gemessene Transfektionseffizienz. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Zellen (Abbildung 4.3 B) konnte die Fragmentierung der chromosomalen DNA in signifikantem Umfang nachgewiesen werden, und zwar in 20 % der transfizierten 293T- und in etwa 35 % der transfizierten HeLa-Zellen. Im Vergleich zur Apoptoseinduktion durch p53, welches als Positivkontrolle herangezogen wurde, verläuft die Apoptoseinduktion mit C33 in HeLa-Zellen langsamer, erreicht aber 65 h nach Transfektion das gleiche Ausmaß wie mit p53, nämlich etwa 23 % aller Zellen bzw. etwa 35 % aller transfizierten Zellen. Wie an dem mit coexprimiertem EGFP-ermittelten Verlauf der Transfektionseffizienz zu erkennen ist, hatte die Expression der Gene bereits 12 h nach der Transfektion eingesetzt und nahm dann bis etwa 27 h nach Transfektion linear zu (vgl. Abbildung 4.3 C).

Um zu überprüfen, ob sich nicht nur der Mausklon C33, der im Screening isoliert worden war, proapoptotisch verhält, sondern ob auch dessen humanes Homolog CD82/KAI-1, das zu 76 % mit dem Mausklon übereinstimmt (Nagira et al., 1994), Apoptose induziert, wurde

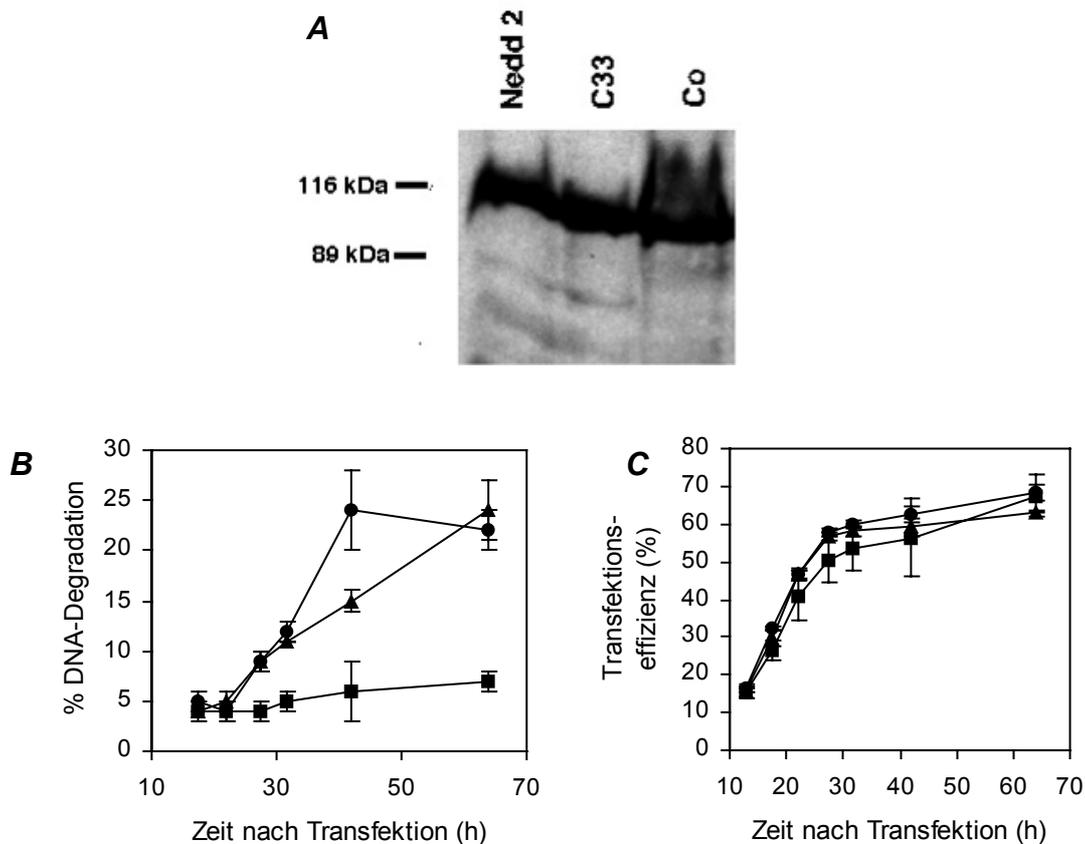


Abbildung 4.3 Spaltung von PARP und Degradation der chromosomalen DNA in C33-transfizierten HeLa-Zellen

(A) C33 und das als Positivkontrolle transfizierten Nedd2 bewirken eine Spaltung des Caspase-Substrates PARP, wodurch im Western-Blot das entstehende 89 kDa-PARP-Fragment als Bande sichtbar wird. Hierzu wurde jeweils eine 10 cm-Schale HeLa-Zellen mit 10 μ g Expressionsplasmid für Nedd2 bzw. C33 sowie mit 2 μ g pEGFP, welches als Expressionskontrolle verwendet wurde, mit der Calciumphosphatmethode transfiziert. Als Negativkontrolle wurden untransfizierten HeLa-Zellen verwendet. 45 h nach Transfektion wurden Kernextrakte hergestellt, von denen 20 μ g elektrophoretisch in einem 6%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet wurden, bevor mit Hilfe eines anti-PARP-Antikörpers und einer Chemilumineszenzreaktion die Banden des unfragmentierten (116 kDa) und des fragmentierten PARP-Moleküls (89 kDa) nachgewiesen wurden. (B) Zeitverlauf der C33(\blacktriangle)- und p53(\bullet)-induzierten DNA-Degradation in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden im 6-well-Format mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert mit 2 μ g Expressionsplasmid für C33, p53 (Positivkontrolle) bzw. Luciferase (Negativkontrolle, \blacksquare) sowie 0,5 μ g pEGFP. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durchflusscytometrisch analysiert. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten. Die erhaltenen Werte wurden nicht auf die Transfektionseffizienz normalisiert (vgl. C). (C) Zeitverlauf des Anteils EGFP-positiver Zellen als Maß für die Transfektionseffizienz der in (B) beschriebenen HeLa-Zellen. Die Expression von EGFP ist bereits 13 h nach Transfektion nachweisbar und erreicht nach 27 h die Sättigung. Unabhängig vom cotransfizierten Plasmid wurden etwa 60 % der Zellen transfiziert. Daher muss der in (B) dargestellte Verlauf der DNA-Degradation keiner Korrektur um unterschiedliche Transfektionseffizienzen unterzogen werden.

dieses aus HeLa-Zellen kloniert und in 293T- und HeLa-Zellen überexprimiert. Wie mit C33 wurde auch mit CD82/KAI1 bei 293T-Zellen eine Abrundung und Apoptose-typische Zunahme des Brechungsindex' der Zellen beobachtet. Bei HeLa-Zellen kam es mit etwa gleicher Kinetik wie mit transfiziertem C33 zum Schrumpfen der Zellen, zur Bildung apoptotischer Körperchen und zur Degradation der chromosomalen DNA, die durchflusscytometrisch nachgewiesen wurde (vgl. beispielsweise Abbildung 4.5). Aufgrund dieses identischen Apoptoseinduktionsmusters der humanen und der Mausvariante des Proteins wurden beide, C33 und CD82/KAI-1, für weitere Untersuchungen verwendet.

4.2.2 C33/CD82-Apoptose erfolgt durch Aktivierung der Mitochondrien

Da C33/CD82 ein Protein der Cytoplasmamembran ist, über dessen molekulare Funktion vergleichsweise wenig bekannt ist, lag es nahe zu prüfen, ob C33/CD82 Apoptose über den Rezeptor-vermittelten oder den mitochondrialen Weg induziert (vgl. Abbildung 1.3). Im ersten Fall könnte es möglicherweise sogar selbst als eine Art Todes-Rezeptor fungieren.

Um zu testen, ob Mitochondrien bei der C33-induzierten Apoptose involviert sind, wurde das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi$, das bei der Aktivierung der Mitochondrien zusammenbricht, in mit C33 transfizierten Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 4.4 A ersichtlich, kommt es 42 h nach Transfektion von C33 zu einer deutlichen Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials in 20 % der Zellen. Dies ist als signifikanter Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials infolge der Expression von C33/CD82 zu werten, obwohl der Effekt etwa 2,8-fach schwächer als in p53-transfizierten Zellen ist, die als Positivkontrolle herangezogen wurden.

Des Weiteren kommt es – wie in Abbildung 4.4 B zu sehen – im Verlauf der C33-induzierten Apoptose spätestens 30 h nach Transfektion zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma und zwar in ähnlichem Umfang, wie mit dem als Positivkontrolle verwendeten Ant1, das eine proapoptotische Komponente der mitochondrialen PT-Pore ist (Bauer et al., 1999).

Da sowohl der beobachtete Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ als auch die festgestellte Freisetzung von Cytochrom c anzeigen, dass Mitochondrien im Verlauf der C33/CD82-induzierten Apoptose aktiviert werden, war zu klären, ob diese Aktivierung für die Apoptoseinduktion essentiell ist, oder ob sie nur einen unwesentlichen Nebeneffekt darstellt. Aus diesem Grund wurde CD82 mit den antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern Bcl-x_L und Bcl-2 coexprimiert, wodurch – wie in Abbildung 4.5 A dokumentiert – die Apoptose vollständig bzw. um 55 % reprimiert werden konnte. Da beide

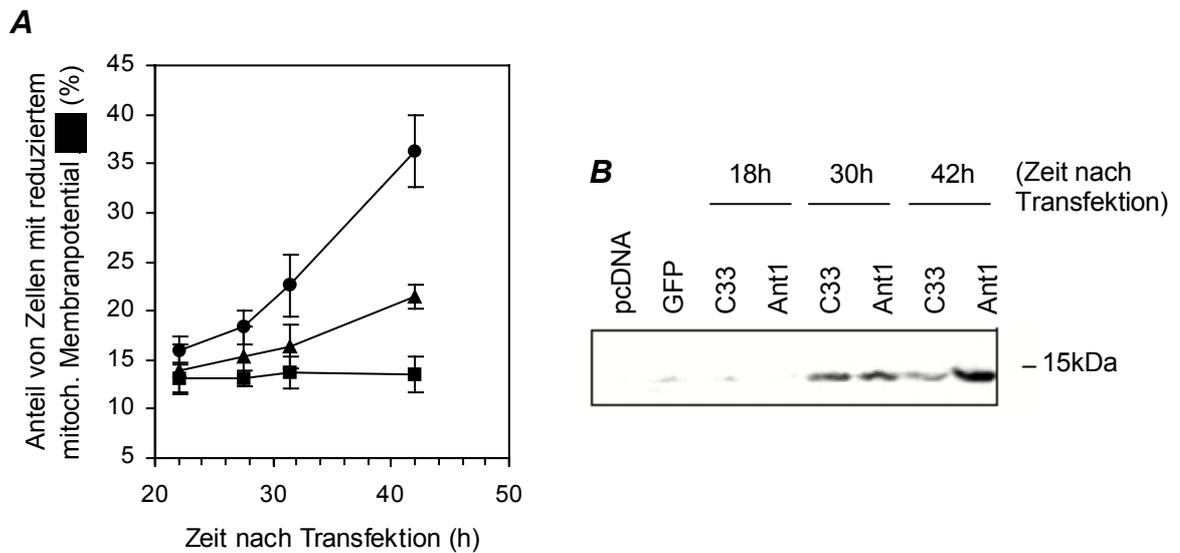


Abbildung 4.4 C33 induziert den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ und die Freisetzung von Cytochrom c

(A) C33 (▲) führt ebenso wie p53 (●) zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in HeLa-Zellen. Signifikant wird dieser Effekt 42 h nach Transfektion, wobei aber p53 im Vergleich zur Luciferase-Kontrolle (■) einen 2,8-fach stärkeren Effekt als C33 hervorruft. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Für den Versuch wurden Aliquots der bereits in Abbildung 4.3 und Abbildung 4.19 beschriebenen HeLa-Zellen verwendet. Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet, mit DiOC₆(3) inkubiert und durchflusscytometrisch analysiert. Da dieser Farbstoff nur von Zellen mit starkem mitochondrialem Membranpotential aufgenommen wird, konnten diese von Zellen mit erniedrigtem Membranpotential durchflusscytometrisch unterschieden werden. (B) C33 führt ebenso wie das als Positivkontrolle verwendete Ant1, einer Komponente der PT-Pore, zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Cytoplasma, das sich 30 h und 42 h nach Transfektion nachweisen lässt. Abgebildet ist ein Western-Blot, der mit cytosolischen Extrakten von mit pcDNA oder pEGFP kontrolltransfizierten und mit pC33- und pAnt1-transfizierten HeLa-Zellen hergestellt wurde, die zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet wurden. Die Extrakte wurden im Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet, bevor nach Inkubation mit einem anti-Cytochrom c-Antikörper die etwa 14 kDa große Cytochrom c-Bande durch eine Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht wurde. In cytosolischen Extrakten von kontrolltransfizierten oder nach 18 h geernteten Zellen ist dagegen keine klare Cytochrom c-Bande nachweisbar (in Zusammenarbeit mit M. Bauer, MPI für Biochemie).

Moleküle die Aktivierung der Mitochondrien für die Apoptoseinduktion unterbinden (vgl. Kapitel 1.2.2 und Abbildung 1.4), muss insbesondere aus der mit Bcl-x_L erzielten vollständigen Repression gefolgert werden, dass die Aktivierung von Mitochondrien für die C33/CD82-induzierte Apoptose essentiell ist. Dieser Schluss wird zusätzlich untermauert durch die in Abbildung 4.5 B dargestellten Ergebnisse der Coexpression von CD82 mit den inhibitorischen Apoptose-Proteinen IAP-2 und XIAP: IAP-2, das die Aktivierung der

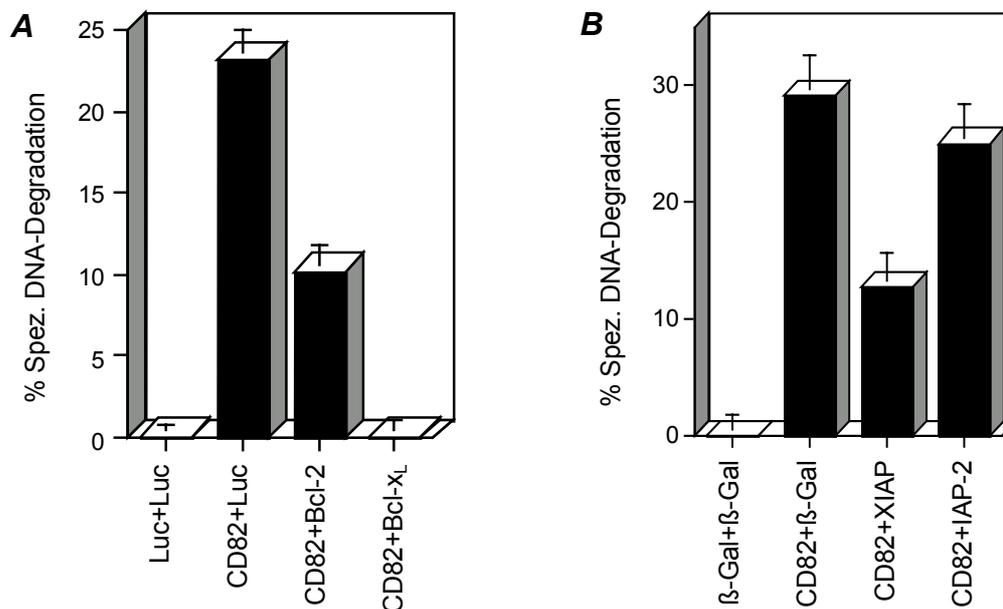


Abbildung 4.5 Inhibition der CD82-Apoptose durch Bcl-2, Bcl-x_L und XIAP, nicht aber durch IAP-2

(A) Durch Cotransfektion von Bcl-2 wird die CD82-Apoptose um 55 % gesenkt, durch Cotransfektion von Bcl-x_L sogar vollständig aufgehoben. Hierzu wurden HeLa-Zellen im 12-*well*-Format mit 50 ng eines Expressionsplasmids für Luciferase bzw. CD82 und 100 ng pLucCMV, pSFFVBcl-2 oder pBcl-x_LHA sowie mit 25 ng pEGFP transfiziert. 41 h nach der Transfektion mit Effectene wurde der Anteil an Zellen mit degradiertem DNA durchflusscytometrisch bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP gemessene Transfektionseffizienz. **(B)** CD82-Apoptose lässt sich signifikant durch Cotransfektion von XIAP, nicht aber von IAP-2 hemmen. Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen im 12-*well*-Format mit 50 ng eines Vektors für β -Galactosidase oder CD82 sowie mit 75 ng p β -Gal, pXIAP oder pIAP-2HA und 25 ng pEGFP mit Effectene transfiziert. Der Anteil an Zellen mit degradiertem DNA wurde 42 h nach Transfektion durchflusscytometrisch bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP ermittelte Transfektionseffizienz.

rezeptorassoziierten Caspase-8 unterbindet (Wang et al., 1998), kann CD82-induzierte Apoptose nicht signifikant reduzieren. Im Gegensatz dazu senkt XIAP, welches die Aktivität von Caspase-9, -3 und -7 reprimiert (Bratton et al., 2001; Chai et al., 2001; Srinivasula et al., 2001), CD82-induzierte Apoptose um 56 %. Dies bedeutet, dass sowohl Inhibitoren wie Bcl-2 und Bcl-x_L, die die Aktivierung der Mitochondrien für die Apoptoseinduktion unterbinden, als auch Inhibitoren wie XIAP, die die Weiterleitung des von Mitochondrien ausgehenden proapoptischen Signals verhindern, C33/CD82-

induzierte Apoptose inhibieren. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Aktivierung der Mitochondrien für die C33/CD82-induzierte Apoptose essentiell ist.

4.3 Funktionelle Eingrenzung der proapoptischen Aktivität von C33/CD82

Die Metastasen-supprimierende Eigenschaft von C33/CD82 wurde bislang auf dessen Fähigkeit, die Motilität der Zellen zu beeinflussen zurückgeführt. Wie in Kapitel 1.5.3 dargestellt, interagiert C33/CD82 mit verschiedenen Integrinen und beeinflusst so die Zelladhäsion und -migration auf Komponenten der extrazellulären Matrix. Außerdem interagiert es mit E-Cadherin, das eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielt, beschleunigt die Internalisierung des EGF-Rezeptors und interagiert mit Proteinkinasen vom PKC-Typ (vgl. Kapitel 1.5.3). Aus diesen Gründen sollte geklärt werden, ob diese Eigenschaften von C33/CD82 Ursache der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen proapoptischen Fähigkeit des Moleküls sind. Hierzu wurde auch untersucht, ob die mit C33/CD82 beobachtete Apoptoseinduktion für C33/CD82 spezifisch, oder ein allgemeines, unspezifisches, durch die Überexpression bestimmter Membranproteine ausgelöstes Phänomen ist.

4.3.1 Spezifität der C33/CD82-induzierten Apoptose

Proteine der Cytoplasmamembran passieren im Verlauf ihrer Prozessierung das endoplasmatische Retikulum (ER), welches – zumindest bei der Maus – mit Caspase-12 über eine Initiator-Caspase verfügt, die bei ER-Stress Apoptose induzieren kann (Nakagawa et al., 2000). Um zu klären, ob die Überexpression von C33/CD82 durch Erzeugung von ER-Stress oder durch unspezifische Störung des Proteingleichgewichts innerhalb der Cytoplasmamembran Apoptose induziert, wurden andere Proteine der Cytoplasmamembran in gleicher Weise wie C33/CD82 in Zellen transfiziert und überexprimiert. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, induzieren im Gegensatz zu dem Tetraspanin C33/CD82 weder der überexprimierte EGF- und PDGF-Rezeptor noch die überexprimierten Integrin-untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 1$ Apoptose in signifikantem Umfang, obwohl sie – mit Ausnahme des PDGF-Rezeptors – mit dem Tetraspanin-Netzwerk assoziiert vorliegen sollten (Odintsova et al., 2000; Ono et al., 2000). Dies bedeutet, dass die C33/CD82-induzierte Apoptose mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch unspezifischen ER-Stress und auch

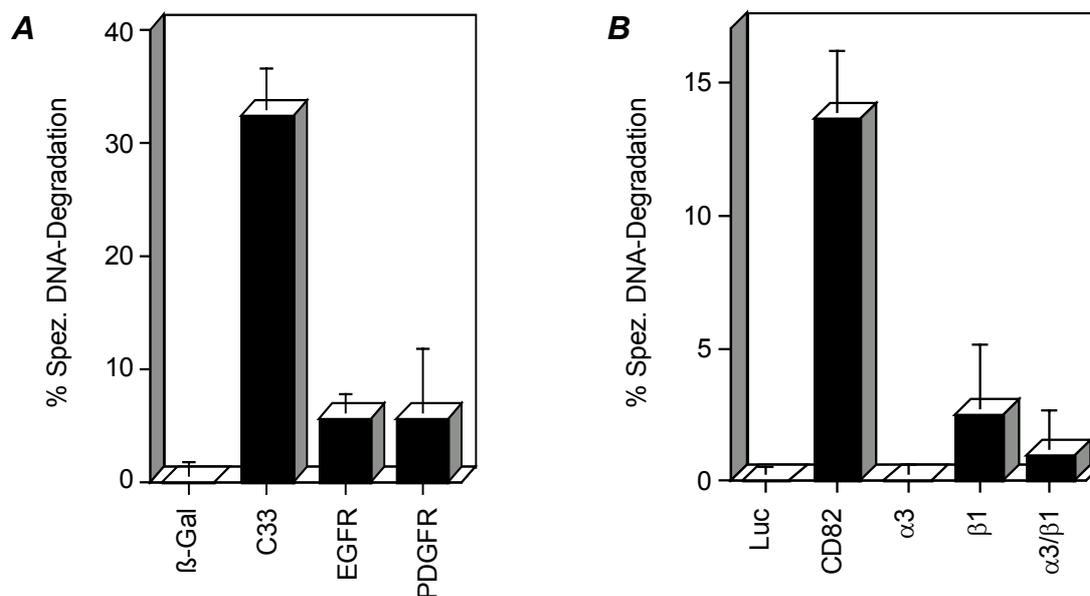


Abbildung 4.6 Die Apoptoseinduktion durch C33/CD82 ist sehr spezifisch

(A) Im Gegensatz zu C33, welches unter diesen Bedingungen 33 % Apoptose induziert, induzieren Membranproteine wie der EGF- oder PDGF-Rezeptor maximal 6 % Apoptose. Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen im 12-*well*-Format mit jeweils 100 ng β -Gal, pRK5-Herc bzw. pcDNA3VSV-PDGFR sowie 25 ng pEGFP transfiziert. 43 h nach der Transfektion mit Effectene wurde der Anteil an Zellen mit degradiertem DNA durchflusscytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP gemessene Transfektionseffizienz. **(B)** Verschiedene Integrin-Untereinheiten induzieren maximal 2,5 % Apoptose. Hierbei wurden HeLa-Zellen im 12-*well*-Format mit jeweils 125 ng pLucCMV, pCD82HA, pFneo- α 3-WT und pECE- β 1 bzw. jeweils 62,5 ng pFneo- α 3-WT und pECE- β 1 sowie 25 ng pEGFP transfiziert. 48 h nach Transfektion mit Effectene wurde der Anteil an Zellen mit degradiertem DNA durchflusscytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP gemessene Transfektionseffizienz.

nicht durch unspezifische Störung des Proteingleichgewichts innerhalb der Cytoplasmamembran bedingt ist. Dafür sprechen auch die Beobachtungen, dass beim Screening nicht überproportional viele Membranproteine als positiv isoliert wurden und dass – wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben – C33/CD82 auch ohne Überexpression die Fähigkeit von Zellen, in die Apoptose zu gehen, positiv beeinflusst. Weitere Argumente für die Spezifität der Apoptoseinduktion liefern die im folgenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse, dass einige, aber nicht alle Mitglieder der Tetraspanin-Superfamilie Apoptose induzieren.

4.3.2 Weitere Mitglieder der Tetraspanin-Familie induzieren Apoptose

Die Superfamilie der Tetraspanine, der C33/CD82 angehört, umfasst mindestens 26 Mitglieder, die Teil des Tetraspanin-Netzwerks in der Cytoplasmamembran sind. Sie vermitteln Kontakte zwischen Kinasen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Integrinen und zumindest einige von ihnen, z.B. CD9, CD63 und CD82 beeinflussen die Motilität und Metastasierungseigenschaften einer Zelle. Allerdings wurde bislang kein Mitglied der Familie mit der Induktion von Apoptose in Zusammenhang gebracht (Boucheix und Rubinstein, 2001).

Zur Überprüfung, ob nur C33/CD82 in der Lage ist, Apoptose zu induzieren, wurden sieben weitere Mitglieder aus verschiedenen Untergruppen der Kerngruppe der Superfamilie (vgl. Abbildung 4.7) kloniert und transient in HeLa-Zellen transfiziert. Alle Proteine waren in gleicher Menge in den Zellen vorhanden (Abbildung 4.8 B), was den Vergleich ihrer Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, erlaubt. Wie in Abbildung 4.8 A dargestellt, induzieren CD81, CD9, CD37 und CD151 ebenso wie CD82 in über 25 % der transfizierten Zellen

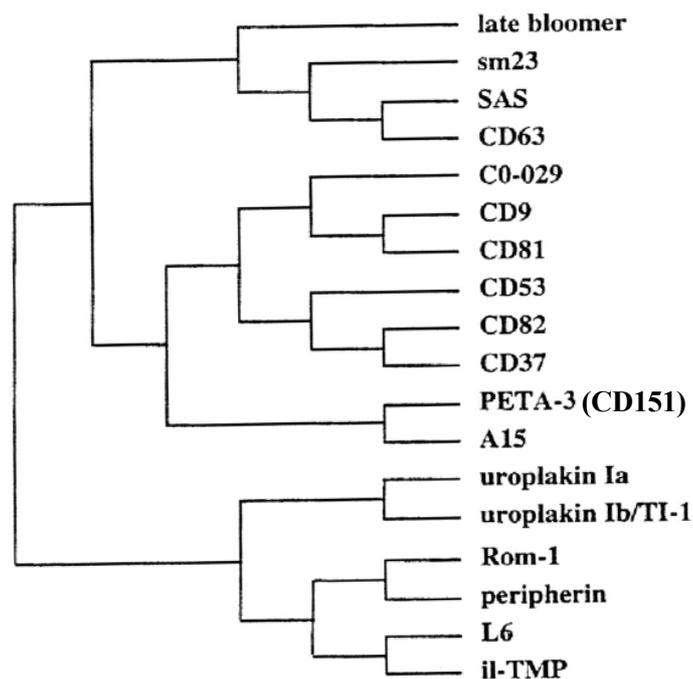


Abbildung 4.7 Dendrogramm der Tetraspanin-Superfamilie

Dendrogramm mit konstanten Verzweigungslängen von 18 Mitgliedern der Tetraspanin-Superfamilie (Maecker et al., 1997). Zu den Kernmitgliedern der Familie zählen u.a. das Drosophila-Protein *late bloomer* sowie CD63, CO-029, CD9, CD81, CD53, CD82, CD37 und CD151 (PETA-3). Nur geringe Homologien zur Kerngruppe finden sich dagegen bei den Uroplakinen, Rom-1, Peripherin, L6 und il-TMP.

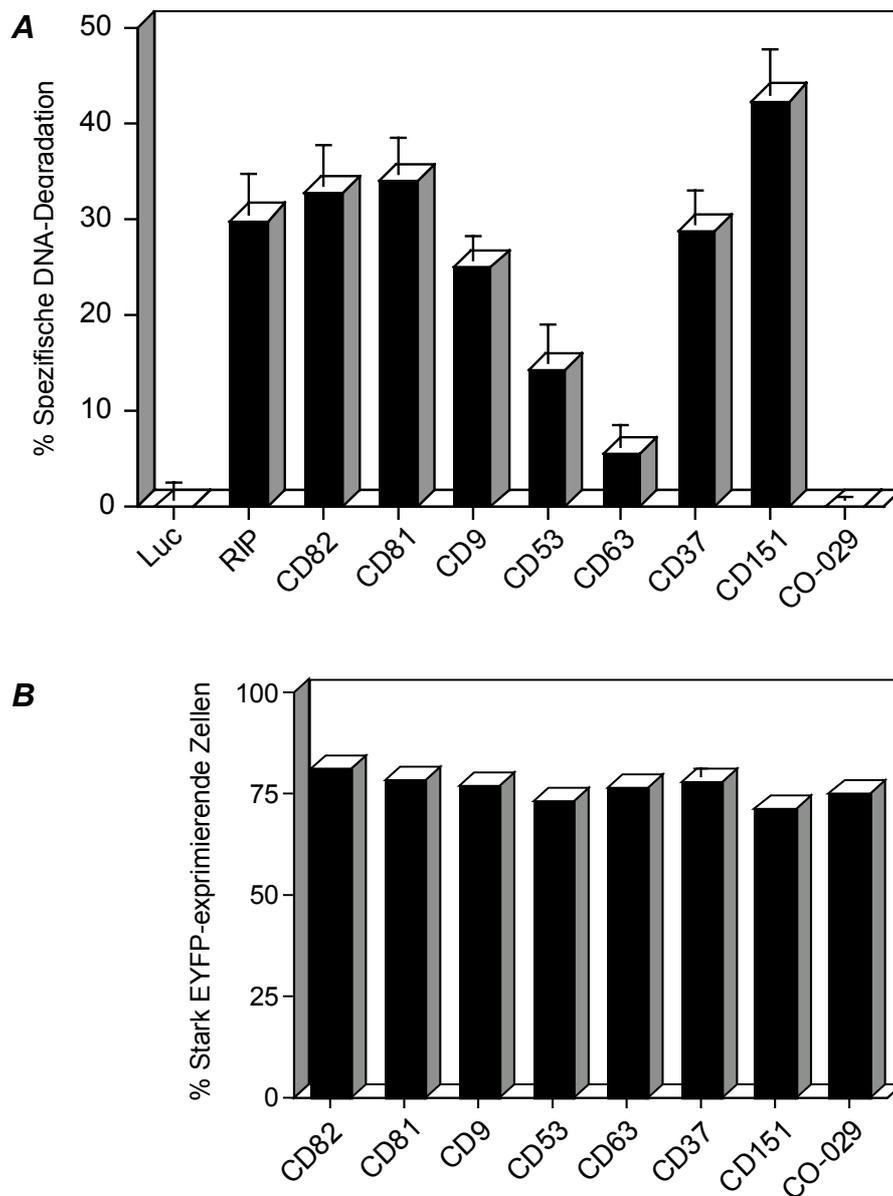


Abbildung 4.8 Apoptoseinduktion durch andere Mitglieder der Tetraspanin-Superfamilie

(A) Expressionsplasmide für humane Mitglieder der Tetraspanin-Superfamilie wurden mittels PCR aus HeLa-Gesamt-RNA kloniert und zusammen mit Vektoren für RIP (einer als Positivkontrolle verwendeten Komponente des TNF-Rezeptorkomplexes) sowie für Luciferase (Negativkontrolle) in HeLa-Zellen transfiziert. 47 h nach Transfektion von 100 ng Expressionsplasmid und 25 ng pEGFP mit Effectene im 12-well-Format wurde die Apoptoseinduktion durch durchflusscytometrische Bestimmung des Anteils von Zellen mit degradiertem DNA quantifiziert. Alle Klone mit Ausnahme von CO-029 induzieren Apoptose; CD63 und CD53 jedoch nur in geringerem Umfang (6 bzw. 14 %). Am stärksten ist die Induktion durch CD151 (42%), gefolgt von CD81, CD82, CD37 und CD9 mit 34, 32, 29 und 25 %. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils 4 unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP gemessene Transfektionseffizienz. (B) Parallel dazu klonierte Fusionsproteine der Tetraspanine mit EYFP am C-Terminus, die ebenfalls in HeLa-Zellen transfiziert wurden, zeigen an, dass die verschiedenen Tetraspanine

in etwa gleichen Mengen in den Zellen vorhanden sind. Lediglich Schwankungen zwischen 71 % (CD151) und 81 % (CD82) stark EYFP-exprimierender Zellen wurden gefunden. Für das Experiment wurden HeLa-Zellen im 12-*well*-Format mit 100 ng eines EYFP-Fusionsvektors des jeweils angegebenen Tetraspanins transfiziert. Nach 22 h Inkubation, die zur Unterdrückung von Apoptose in Gegenwart von 50 μ M zVAD durchgeführt wurde, wurde das EYFP-Expressionsniveau durchflusscytometrisch bestimmt. Angegeben ist der Anteil stark YFP-exprimierender Zellen bezogen auf die Gesamtmenge EYFP-exprimierender Zellen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Apoptose. Dahingegen induzieren CD53 und CD63 mit 14 bzw. 6 % signifikant weniger Apoptose als CD82 und CO-029 führt zu keinerlei apoptotischen Veränderungen.

In der Dendrogramm-Darstellung (Abbildung 4.7) bilden die proapoptotischen Tetraspanine keine eigene Untergruppe. Um dennoch zu ermitteln, ob es einen minimalen übereinstimmenden Bereich zwischen den Apoptose-induzierenden Tetraspaninen gibt, der für die Apoptoseinduktion verantwortlich sein könnte, wurden die entsprechenden Proteinsequenzen miteinander verglichen. Es konnten jedoch keine gemeinsamen Aminosäurereste identifiziert werden, die sich von denen bei CO-029 und CD63 unterschieden; selbst dann nicht, als die Suche aufgrund der mit den Deletionsmutanten erhaltenen Ergebnisse (vgl. Abschnitt 4.3.3) auf die ersten 119 Aminosäurereste begrenzt wurde.

Auch wenn durch Proteinsequenzanalyse kein gemeinsamer Bereich identifiziert werden konnte, der für die Apoptoseinduktion durch die verschiedenen Tetraspanine verantwortlich ist, ist dennoch davon auszugehen, dass es sich um eine spezifische Wirkung – beispielsweise einen gemeinsamen Interaktionspartner – handelt, da z.B. CD63 und CO-029 im Gegensatz zu den anderen getesteten Tetraspaninen keine Apoptose induzieren. Worauf die Wirkung der proapoptotischen Tetraspanine beruhen könnte, sollte daher mit Hilfe von Deletionsmutanten eingegrenzt werden.

4.3.3 Der cytoplasmatische C-Terminus und die große extrazelluläre Schleife sind für C33/CD82-Apoptose nicht erforderlich

C33/CD82 ist ein Mitglied der Tetraspanin-Superfamilie, das in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Das Protein verfügt über vier Transmembrandomänen sowie über eine große stark glykosylierte extrazelluläre Schleife; die N- und C-terminalen cytoplasmatischen Regionen des Proteins umfassen lediglich 9 bzw. 13 Aminosäuren (vgl. Abschnitt 1.5).

Um den für die Apoptoseinduktion relevanten Bereich von C33/CD82 zu identifizieren, wurde das aus 267 Aminosäuren bestehende Protein sukzessive vom C-Terminus her deletiert: Es wurde eine Mutante (C33 Δ 255) generiert, der lediglich der C-terminale cytoplasmatische Teil fehlt. Dieser fehlt somit das YSKV-Motiv, welches – wie in Abschnitt

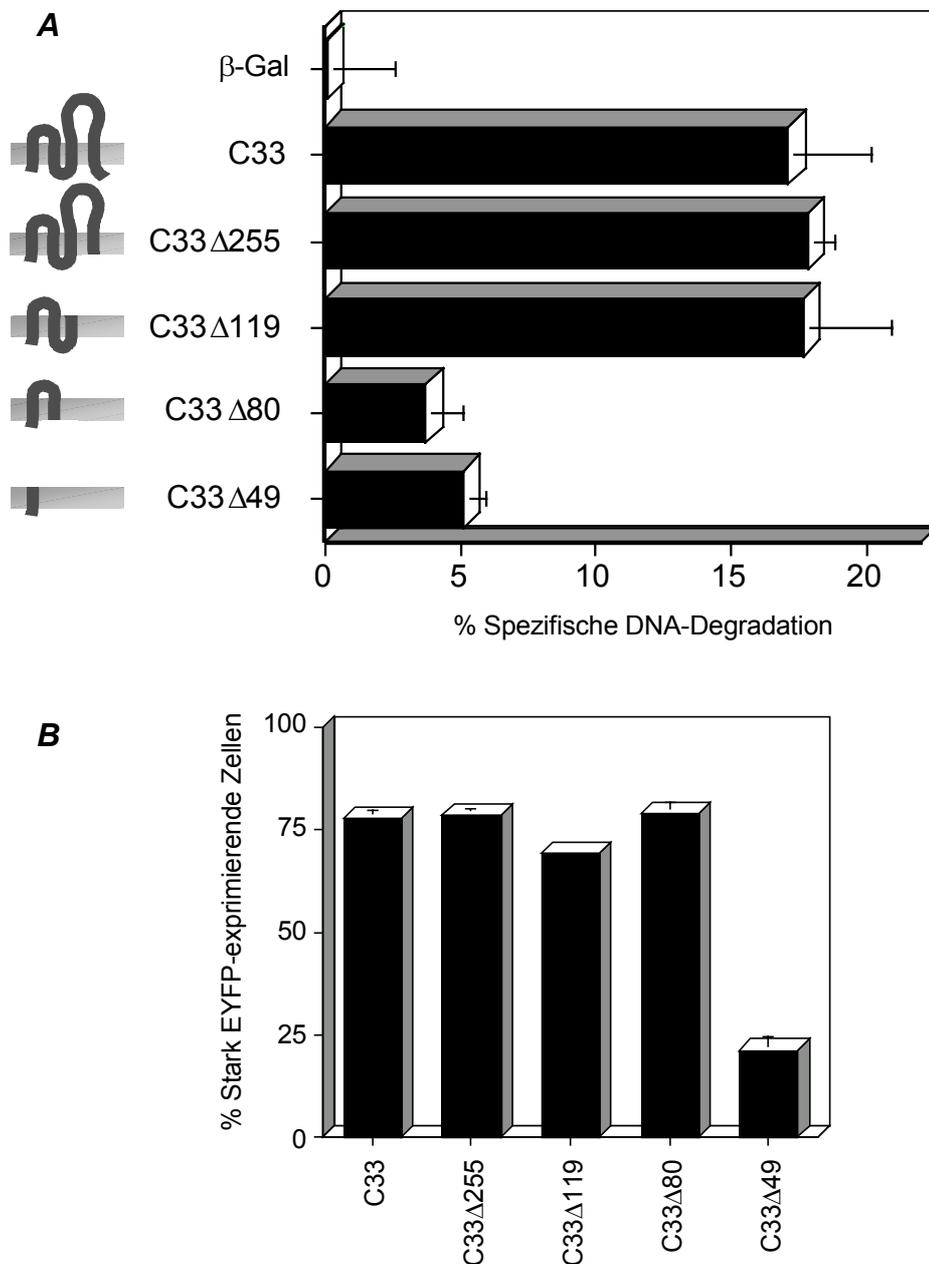


Abbildung 4.9 Apoptoseinduktion durch C33-Deletionsmutanten

(A) Der Apoptose induzierende Bereich von C33 wurde durch sukzessive C-terminale Deletionen eingegrenzt (linker Teil der Abbildung). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Dazu wurden HeLa-Zellen mit der Calciumphosphat-Methode mit jeweils 1 μ g Expressionsplasmid und 0,25 μ g pEGFP im 12-*well*-Format transfiziert. Nach 44 h wurden die Zellen geerntet. Danach wurde der Anteil an Zellen mit degradiertem DNA durchflusscytometrisch analysiert. Die erhaltenen Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP durchflusscytometrisch bestimmte Transfektionseffizienz. (B) Parallel dazu klonierte Fusionsproteine von C33 und den Deletionsmutanten mit EYFP am C-Terminus, die ebenfalls in HeLa-Zellen transfiziert wurden, zeigen an, dass C33, C33 Δ 255, C33 Δ 119 und C33 Δ 80 in etwa gleichen Mengen in den Zellen vorhanden sind. Für das Experiment wurden

HeLa-Zellen im 12-well-Format mit 100 ng eines Fusionsvektors des jeweils angegebenen Tetraspanins mit EYFP mit Effectene transfiziert. Nach 24 h Inkubation, die zur Unterdrückung von Apoptose in Gegenwart von 50 μ M zVAD durchgeführt wurde, wurde das EYFP-Expressionsniveau durchflusscytometrisch bestimmt. Angegeben ist der Anteil stark EYFP-exprimierender Zellen bezogen auf die Gesamtmenge EYFP-exprimierender Zellen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

1.5.3 beschrieben – die Internalisierung des EGF-Rezeptors vermitteln könnte (Boll et al., 1996; Hammond et al., 1998; Odintsova et al., 2000). Weiterhin wurde die Mutante C33 Δ 119 kloniert. Diese dürfte aufgrund der fehlenden großen, glykosylierbaren extrazellulären Schleife nicht mehr mit Integrinen interagieren (Ono et al., 2000). Außerdem entstanden die Mutanten C33 Δ 80 und C33 Δ 49, die lediglich über die ersten beiden, bzw. nur über die erste Transmembrandomäne verfügen.

Wie Versuche mit EYFP-Fusionsproteinen ergaben (Abbildung 4.9 B), liegen die mutierten Proteine C33 Δ 255, C33 Δ 119 und C33 Δ 80 etwa gleicher Menge wie C33 in der Zelle vor. Im Gegensatz dazu sind, möglicherweise bedingt durch eine geringere Stabilität der Mutante, deutlich geringere Mengen von C33 Δ 49 vorhanden. Dies bedeutet, dass wegen der vergleichbaren Expressionsniveaus das Ausmaß der Apoptoseinduktion der drei längeren Mutanten mit dem des Wildtypproteins verglichen werden kann. Die durchflusscytometrische Bestimmung des Anteils an Zellen mit degradiertem DNA (vgl. Abbildung 4.9 A) ergab, dass C33 Δ 255 und C33 Δ 119 ebenso wie das Wildtyp-Protein in 18 % der Zellen Apoptose induzieren, während die Deletionsmutante C33 Δ 80 und auch die Deletionsmutante C33 Δ 49 in weniger als 5 % der Zellen Apoptose hervorrufen, letztere allerdings bei verminderter Proteinmenge.

Da C33 Δ 255 ebensoviel Apoptose wie C33-Wildtyp induziert, scheint das im C-terminalen cytoplasmatischen Bereich befindliche YSKV-Motiv – und damit die mögliche beschleunigte Internalisierung des EGF-Rezeptors – nicht für die Apoptoseinduktion verantwortlich zu sein. Auch ein Einfluss der großen extrazellulären Domäne auf die Apoptoseinduktion kann ausgeschlossen werden, da die Mutante C33 Δ 119 ebensoviel Apoptose wie C33-Wildtyp induziert. Dies bedeutet, dass der Apoptose-induzierende Bereich in den ersten 119 Aminosäuren des Proteins lokalisiert sein muss. Die Aussage, ob der Bereich mit den Aminosäuren 80 bis 119 hierfür verantwortlich ist, wie dies die unterschiedliche Apoptoseinduktion der Mutanten C33 Δ 80 und C33 Δ 119 nahelegt, kann nicht getroffen werden, da das Protein C33 Δ 80 zwar stabil ist (vgl. Abbildung 4.9 B), aber möglicherweise wegen der fehlenden Bereiche nicht korrekt gefaltet und damit nicht funktionell sein könnte.

4.3.4 Ein Effekt des EGF-Rezeptors auf C33/CD82-induzierte Apoptose ist nicht nachweisbar

In Abschnitt 4.2.2 wurde nachgewiesen, dass C33/CD82 Apoptose über den mitochondrialen Weg erfolgt. Da auch die verminderte Exposition von Wachstumsfaktor-Rezeptoren Apoptose über den mitochondrialen Weg induziert und C33/CD82 nach Untersuchungen von Odintsova et al. die Internalisierung des EGF-Rezeptors beschleunigt (Odintsova et al., 2000), könnte dies die Ursache der C33/CD82-Apoptose sein: Die durch Überexpression von C33/CD82-vermittelte Herabregulation des EGF-Signalwegs könnte dadurch Apoptose induzieren, dass weniger antiapoptotische Bcl-2-Homologa wie Bcl-x_L gebildet werden (Jost et al., 1999) und proapoptotische Bcl-2-Homologa wie Bad aktiviert werden (vgl. Abbildung 1.4).

Nach den Ergebnissen, die mit den trunkierten Varianten von C33 erzielt wurden (Abschnitt 4.3.3) ist der C-terminale cytoplasmatische Teil von C33/CD82, der mit dem YSKV-Motiv über ein potentiell Internalisierungssignal verfügt (Escola et al., 1998; Hammond et al., 1998), für die C33/CD82-Apoptose nicht erforderlich. Das legt bereits den Schluss nahe, dass die durch C33/CD82 vermittelbare beschleunigte Internalisierung des EGF-Rezeptors (Odintsova et al., 2000) nicht für die Apoptoseinduktion durch das Protein verantwortlich ist. Um zu klären, ob die Interaktion mit dem EGF-Rezeptor tatsächlich keinen Einfluss auf die C33/CD82-Apoptose hat, wurden mit C33 folgende Proteine coexprimiert: der EGF-Rezeptor, eine dominant-negative Variante des Rezeptors, ein weiteres Mitglied der EGF-Rezeptorfamilie (Her2), das auch mit dem EGF-Rezeptor interagiert (Campiglio et al., 1999) und der PDGF-Rezeptor. Dabei dienten Her2 und der PDGFR als Kontrollen für Membranrezeptoren, die keinen Einfluss auf die C33/CD82-Apoptose haben sollten, da sie – soweit bekannt – nicht mit dem Tetraspanin interagieren. Die dominant-negative Variante des Rezeptors, der die cytoplasmatische Domäne fehlt, wurde verwendet, um zu ermitteln, ob der EGFR für die Beeinflussung der C33/CD82-Apoptose funktionell sein muss, und um festzustellen, ob die Inaktivierung des EGFR alleine für eine Apoptoseinduktion ausreichend ist. Wie in Abbildung 4.10 dargestellt, induzieren die alleine transfizierten Rezeptoren (Transfektion nur zusammen mit p β -Gal) keine Apoptose, auch nicht die dominant-negative Variante des EGFR. Das bedeutet, dass die Herabregulation des EGF-Signalwegs durch den dominant-negativen Rezeptor nicht zur Apoptoseinduktion ausreicht und bestätigt die Hypothese, dass auch eine C33/CD82-bedingte Herabregulation des EGF-Signalwegs durch beschleunigte Internalisierung des EGF-Rezeptors – so sie in diesem

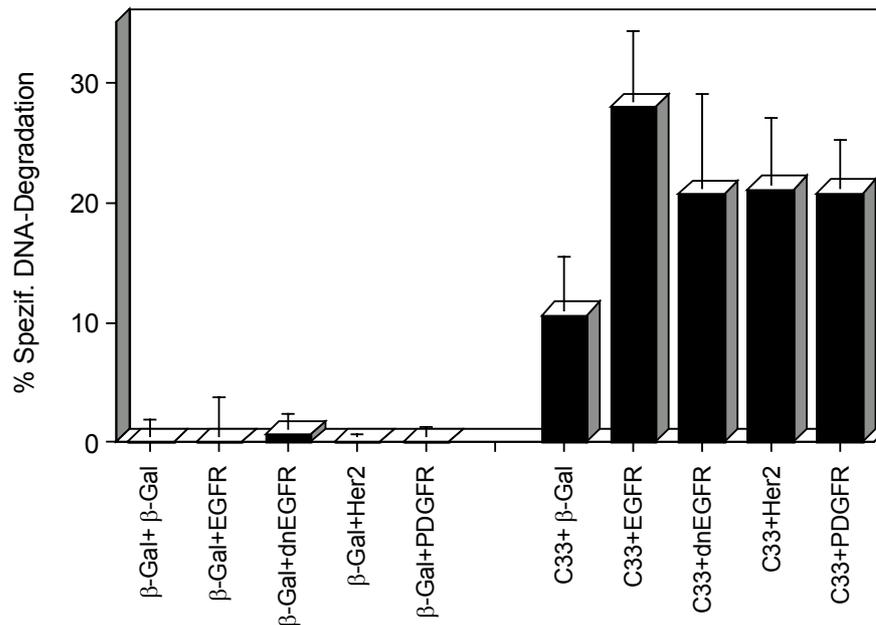


Abbildung 4.10 Eine Inhibition der C33-Apoptose durch cotransfizierte Zelloberflächenrezeptoren ist nicht nachweisbar.

Der EGF-Rezeptor (EGFR), seine dominant-negative Variante (dnEGFR), Her2 und der als weitere Kontrolle mitgeführte PDGF-Rezeptor (PDGFR) induzieren alleine (zusammen mit β -Gal) keine Apoptose. Des Weiteren inhibiert keiner dieser Rezeptoren C33-induzierte Apoptose. Für das Experiment wurden HeLa-Zellen im 12-*well*-Format mit jeweils 50 ng Expressionsplasmid für β -Gal bzw. C33 sowie mit 50 ng p β -Gal, pRK5-Herc (EGF-Rezeptor), pRK5-HerNA8 (dominant negative Variante des EGF-Rezeptors), pRK5-Her2 bzw. pcDNA3VSV-PDGFR sowie 25 ng pEGFP transfiziert. 43 h nach der Transfektion mit Effectene wurde der Anteil an Zellen mit degradiertem DNA durchflusscytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP gemessene Transfektionseffizienz.

Zellsystem überhaupt erfolgt – nicht die Ursache der beobachteten Apoptoseinduktion ist. In Übereinstimmung damit reprimiert weder die Cotransfektion des EGF-Rezeptors noch die seiner dominant-negativen Variante die C33-induzierte Apoptose. Auch die beiden anderen Rezeptoren, Her2 und PDGFR, beeinflussen die C33-Apoptose nicht. Die bei der Cotransfektion von C33 und dem EGFR beobachtete leichte Verstärkung der Apoptose ist nicht signifikant, insbesondere, da alle anderen cotransfizierten Rezeptoren eine leichte, ebenfalls nicht signifikante Verstärkung der C33-Apoptose bewirken und sich die Fehlerbalken überlappen.

Ein weiteres Argument dafür, dass die C33/CD82-Apoptose unabhängig vom EGF-Rezeptor erfolgt ist, dass – wie in Abschnitt 4.3.2 demonstriert – einige andere Tetraspanine

wie C33/CD82 Apoptose induzieren, obwohl sie laut Literatur nicht mit dem EGF-Rezeptor interagieren, während CD63, welches neben CD82 mit dem EGF-Rezeptor interagiert, keine Apoptose induziert (Bienstock und Barrett, 2001). Aufgrund all dieser Argumente ist daher davon auszugehen, dass die Interaktion mit dem EGF-Rezeptor für die C33/CD82-induzierte Apoptose nicht von Bedeutung ist.

4.3.5 Die Interaktion von C33/CD82 mit Proteinkinase C ist vermutlich nicht die Ursache der Apoptoseinduktion

Innerhalb der ersten 119 Aminosäuren von C33/CD82, die den proapoptotischen Bereich des Proteins ausmachen (vgl. Abschnitt 4.3.3), liegt der Bereich, über den C33/CD82 vermutlich mit der Proteinkinase PKC interagieren kann (Zhang et al., 2001). Aufgrund dessen könnte theoretisch die Interaktion mit PKC für die C33/CD82-induzierte Apoptose verantwortlich sein. Nach Untersuchungen von Zhang et al. rekrutieren CD82 und einige andere Tetraspanine verschiedene Proteinkinasen, insbesondere PKC α und PKC β 2, in die Nähe von Integrinen: diese phosphorylieren so beispielsweise die α 3-Untereinheit der Integrine und beeinflussen auf diese Weise zelluläre Signalwege.

Dass die Phosphorylierung der Integrine durch PKC für die C33/CD82-induzierte Apoptose relevant ist, kann ausgeschlossen werden, da die Deletionsmutante C33 Δ 119 Apoptose induziert, obwohl sie aufgrund der fehlenden großen extrazellulären Schleife keine Integrine an die Tetraspanin-Komplexe rekrutieren kann (Ono et al., 2000), die dann folglich auch nicht mehr phosphoryliert werden können. Weiterhin spricht die mit den anderen Tetraspaninen beobachtete Apoptose gegen eine Beteiligung der Proteinkinasen bei der Apoptoseinduktion: Zhang et al. beschreiben die Interaktion von CD9, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 mit PKCs. Zwar induziert CD63, welches bei Zhang et al. die schwächste Interaktion zeigte, auch nahezu keine Apoptose, doch induzieren CD9 und CD53, die besonders stark mit PKC interagieren, weniger Apoptose als beispielsweise CD82, welches nur mittelmäßig mit PKC interagiert (vgl. Abbildung 4.8). Aufgrund dessen kann keine Korrelation zwischen der Intensität der Interaktion mit PKC und der Apoptoseinduktion des jeweiligen Tetraspanins aufgestellt werden. Des Weiteren konnte C33/CD82-induzierte Apoptose durch die Verwendung der PKC-Inhibitoren Chelerythrin D und Calphostin C weder verstärkt noch inhibiert werden (Daten nicht gezeigt). Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion von C33/CD82 mit Proteinkinasen für die proapoptotische Eigenschaft des Tetraspanins nicht von Bedeutung ist.

4.3.6 C33/CD82-Apoptose ist unabhängig von Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix-Interaktionen

Die Funktion von C33/CD82 als Metastasensuppressor wurde bislang auf dessen Adhäsions- und Migrations-beeinflussende Eigenschaft zurückgeführt (vgl. Kapitel 1.5.3). Wie in Abschnitt 4.3.3 dargelegt, scheint die große extrazelluläre Schleife von C33/CD82 und damit die Interaktion mit Integrinen nicht für die Apoptoseinduktion von C33/CD82 verantwortlich zu sein. Da es sich bei der Apoptoseinduktion um eine Eigenschaft handelt, die auch zur metastasierungssupprimierenden Wirkung von C33/CD82 beitragen oder sogar wesentlich dafür verantwortlich sein könnte, zumal das Protein in stark metastasierenden Tumoren und zahlreichen Metastasen herabreguliert ist, wurde durch weitere Experimente überprüft, ob die Apoptoseinduktion unabhängig von der adhäsions- und migrations-beeinflussenden Eigenschaft von C33/CD82 erfolgt.

Da C33/CD82 mit $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -Integrinuntereinheiten interagiert (Boucheix und Rubinstein, 2001; Mannion et al., 1996; Ono et al., 2000), wurde es exemplarisch mit der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit coexprimiert. Darüber hinaus wurde C33/CD82 zusammen mit der entsprechenden $\beta 1$ -Integrinuntereinheit sowie einer Kombination von $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten exprimiert, da Integrine Heterodimere aus α - und β -Untereinheiten sind und nur als solche aktiv sind. Wie in Abbildung 4.11 dargestellt, beeinflusst weder die $\alpha 3$ -Untereinheit, noch die $\beta 1$ -Untereinheit, noch die Kombination beider die C33/CD82-induzierte Apoptose. Auch die Transfektion der Integrinuntereinheiten ohne C33/CD82 hat keine Apoptose hervorgerufen. Dies bedeutet, dass – zumindest unter diesen Versuchsbedingungen – $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Integrinuntereinheiten keinen Einfluss auf die C33/CD82-induzierte Apoptose haben.

Um zu überprüfen, inwieweit die Expression von C33/CD82 das Adhäsions- und Migrationsverhalten von Zellen verändert, wurde die Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 verwendet, die kein CD82-Protein exprimiert, was sowohl in der Literatur beschrieben ist (Sigala et al., 1999; White et al., 1998) als auch durch eigene durchflusscytometrische Bestimmung der CD82-Expression bestätigt wurde (vgl. Abbildung 4.14). Von dieser Zelllinie wurden Derivate hergestellt, die stabil CD82 exprimieren, wobei stark CD82-exprimierende Zellen durchflusscytometrisch abgetrennt und für die Experimente verwendet wurden (Abbildung 4.12 A). Diese wiesen eine ähnlich starke CD82-Expression wie beispielsweise die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 auf (Vgl. Abbildung 4.14). Parallel dazu wurde als Kontrolle die gleiche PC3-Zelllinie mit dem Vektor pcDNA3 transfiziert.

Wie in Abbildung 4.12 B,C dargestellt, beeinflusste die Expression von CD82 weder die Adhäsion der Zellen auf Laminin noch die Motilität der Zellen auf Fibronektin. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen von Ono et al., die sowohl eine Zunahme der Adhäsion auf beiden Substraten als auch eine Zunahme der Motilität auf Fibronektin bei CD82-positiven Idl-Hamsterzellen beobachtet haben (Ono et al., 2000). Daher wurden als Positivkontrolle $\beta 1$ -Integrin defiziente GD25-Zellen und die entsprechende rekonstituierte $\beta 1$ -Integrin-exprimierende Zelllinie $\beta 1$ GD25 verwendet, die – wie in Abbildung 4.12 zu sehen – das von Sakai et al. beschriebene unterschiedliche Adhäsions- und Migrationsverhalten zeigten (Sakai et al., 1998). Dies bedeutet, dass das verwendete Versuchsdesign zwar prinzipiell zur Detektion von Unterschieden im Adhäsions- und Migrationsverhalten geeignet ist, dass sich

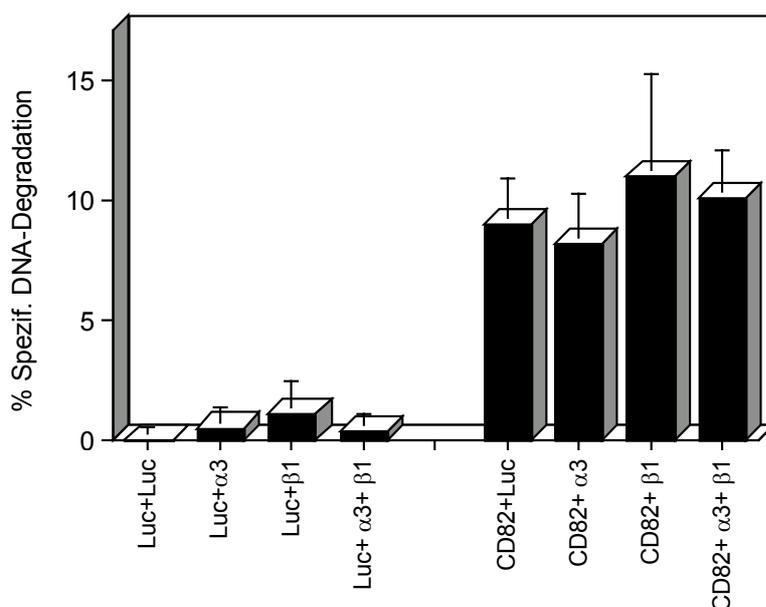


Abbildung 4.11 CD82-Apoptose kann durch Cotransfektion von Integrinen nicht gehemmt werden

Die transfizierten Integrinuntereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 1$ induzieren keine Apoptose. Darüber hinaus hat ihre Cotransfektion keinen Einfluss auf die Stärke der CD82-induzierten Apoptose. Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen im 12-well-Format mit jeweils 50 ng eines Expressionsplasmids für Luciferase bzw. CD82 sowie mit 75 ng pLucCMV, pFneo- $\alpha 3$ -WT und pECE- $\beta 1$ bzw. jeweils 37,5 ng pFneo- $\alpha 3$ -WT und pECE- $\beta 1$ sowie 25 ng pEGFP transfiziert. 48 h nach Transfektion mit Effectene wurde der Anteil an Zellen mit degradiertem DNA durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden auf die mit cotransfiziertem EGFP gemessene Transfektionseffizienz normalisiert.

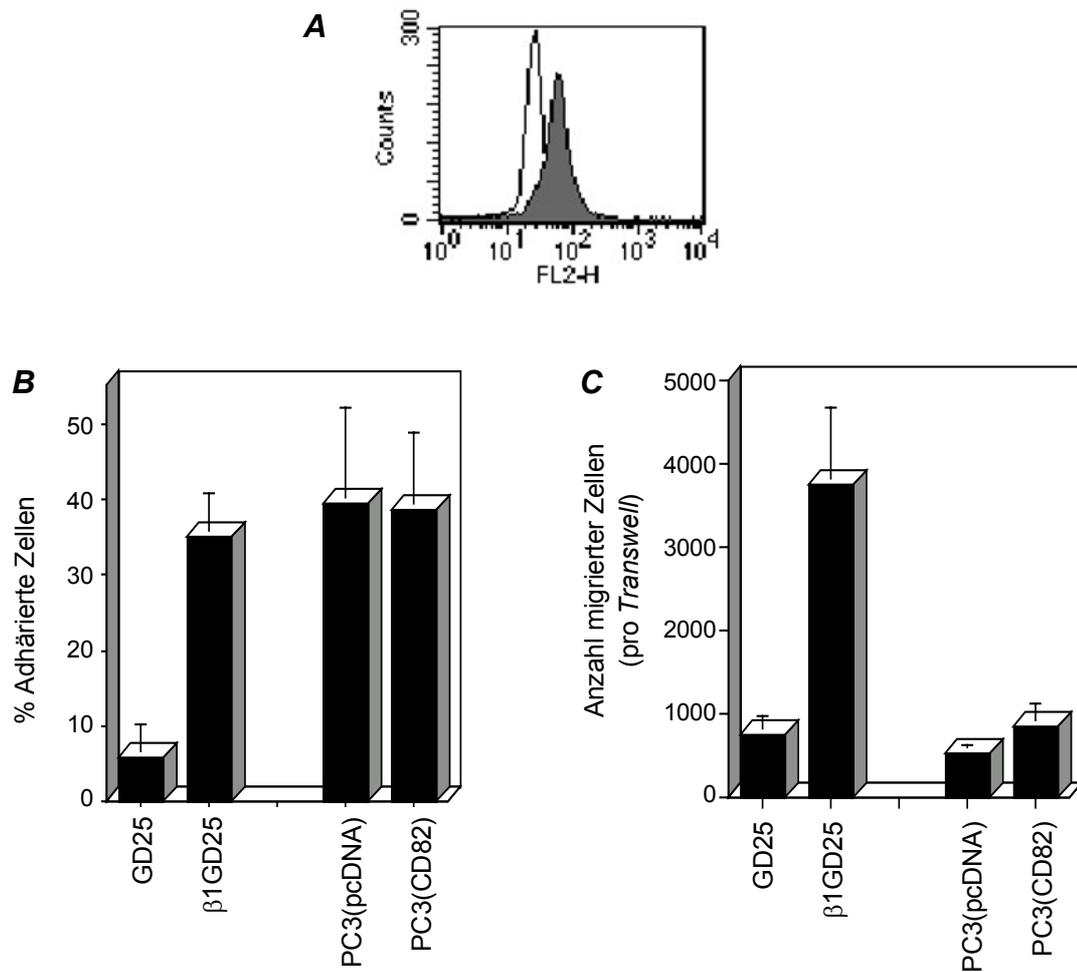


Abbildung 4.12 Die Expression von CD82 beeinflusst weder die Adhäsion von PC3-Zellen an Laminin noch deren Motilität auf Fibronektin

(A) PC3-Zellen, die kein CD82 exprimieren, wurden stabil mit pCD82HA und als Kontrolle mit pcDNA3 transfiziert. Von den transfizierten Zellen wurden stark CD82-exprimierende Zellen durchflusscytometrisch separiert. Eine nach vierwöchiger Kultivierung durchgeführte durchflusscytometrische Untersuchung der CD82-Expression ergab, dass die separierten mit CD82-stabil transfizierten Zellen (grau unterlegt) CD82 exprimieren, im Gegensatz zu den pcDNA-transfizierten Kontrollzellen (schwarze Linie), die sich wie unbehandelte PC3-Zellen verhalten und kein CD82 exprimieren (vgl. Abbildung 4.16). Für den Versuch wurden die Zellen mit einem Phycoerythrin-konjugierten anti-CD82-Antikörper inkubiert und durchflusscytometrisch analysiert. Aufgetragen wurde die Zahl der Zellen (*counts*) gegen die Fluoreszenz im Kanal FL2. (B,C) Zur Kontrolle verwendete GD25- und β1GD25-Zellen zeigten deutliche Unterschiede mit 6 vs. 35 % Adhäsion auf Laminin (B) und 742 vs. 3750 auf Fibronektin migrierten Zellen (C). Dahingegen ist in PC3-Zellen kein Einfluss der CD82-Expression auf das Adhäsionsverhalten (B) und die sogenannte haptotaktische Motilität (C) nachweisbar. Für diese Experimente wurden die in (A) beschriebenen, stark CD82-exprimierenden PC3-Zellen verwendet und mit kontrolltransfizierten PC3-Zellen verglichen, die kein CD82 exprimieren. (B) Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung des Anteils adhärierter Zellen von sechs unabhängigen Experimenten nach 80 minütiger Adhäsion auf $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Laminin. (C) Die Abbildung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der Anzahl der auf $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronektin migrierten Zellen von vier unabhängigen Experimenten nach 6- (GD25-Zellen) bzw. 30-stündiger Inkubation (PC3-Zellen).

jedoch mit den verwendeten CD82-positiven und -negativen PC3-Zellen keine Unterschiede darstellen ließen. Möglicherweise ist dies auf Abweichungen im Integrinexpressionsmuster oder einen zu geringen Einfluss des betreffenden Integrins auf die Adhäsion in den verwendeten PC3-Zellen zurückzuführen. Daher können die im Adhäsions- und Migrationsversuch erhaltenen Resultate nicht hinsichtlich der Bedeutung von CD82 interpretiert werden. Um dennoch eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Adhäsion der Zellen einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion durch C33/CD82 hat, wurde die Apoptoseinduktion in nicht-adhärenenten HeLa-Zellen, die weder Kontakte zu Nachbarzellen noch zur extrazellulären Matrix ausbilden, getestet. Dabei war sowohl das als Positivkontrolle verwendete p53 als auch C33 in der Lage, Apoptose zu induzieren, und zwar in 33 bzw. 21 % der transfizierten HeLa-Zellen (vgl. Abbildung 4.13). Dies bedeutet, dass die Apoptoseinduktion durch C33/CD82 unabhängig von Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre Matrix-Interaktionen ist und damit nicht von E-Cadherin- oder Integrin-vermittelten Signalwegen abhängt. Demzufolge handelt es sich bei der C33/CD82-induzierten Apoptose um ein Phänomen, das unabhängig von der motilitätsbeeinflussenden Wirkung des Proteins zu der beobachteten Metastasen-supprimierenden Wirkung beitragen kann. Im Folgenden wurde die Apoptoseinduktion durch C33/CD82 in verschiedenen Tumorzellen näher untersucht (vgl. Kapitel 4.4).

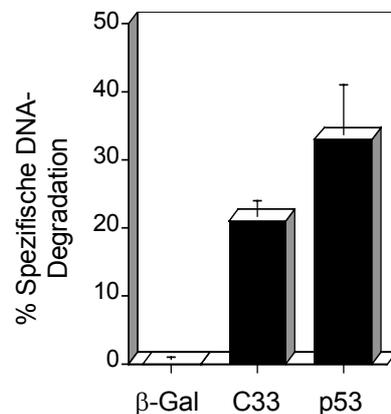


Abbildung 4.13 C33 induziert Apoptose in nicht-adhärenenten Zellen

C33 und das als Positivkontrolle transfizierte p53 induzieren 21 bzw. 33 % spezifische Apoptose in HeLa-Suspensionszellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Jeweils 10^5 Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode mit 3 μ g Expressionsplasmid sowie 1 μ g pEGFP transfiziert. Nach 52 h wurde der Anteil Zellen mit degradiertem DNA durchflusscytometrisch bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfizierten EGFP durchflusscytometrisch ermittelte Transfektionseffizienz.

4.4 Bedeutung der C33/CD82-Expression für Tumorzellen

4.4.1 C33/CD82 induziert Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien

Die Expression des Metastasensuppressors C33/CD82 ist, wie in Kapitel 1.5.3 beschrieben, in zahlreichen stark-metastasierenden Tumoren und Metastasen verschiedenster Tumore herabreguliert. Da viele Tumorzellen im Verlauf ihrer Entstehung resistent gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli geworden sind (vgl. Kapitel 1.4.1), sollte geprüft werden, ob C33/CD82 in verschiedenen Tumorzelllinien noch Apoptose induzieren kann.

Hierzu wurde die Expression von CD82 in drei verschiedenen Tumorzelllinien durchflusscytometrisch untersucht: Wie in Abbildung 4.14 dargestellt, wird CD82 in der Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 nicht exprimiert, während die Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa und die Mammarkarzinom-Zelllinie MCF-7 signifikante Mengen CD82 exprimieren. In diesen drei Zelllinien, die demnach über unterschiedliche endogene Mengen an CD82 verfügen, induziert die Transfektion von C33/CD82 Apoptose in signifikantem Umfang (Abbildung 4.15): So kommt es in etwa 40 % der transfizierten PC3-Zellen zu einer Phänotypveränderung, wie sie auch mit dem als Postivkontrolle verwendeten RIP, einer proapoptotischen Komponente des TNF-Rezeptorkomplexes, zu beobachten ist. Vergleichbare Effekte wurden auch mit den Prostatakarzinomzelllinien DU145 und LNCaP beobachtet (Daten nicht gezeigt), die nach Untersuchungen von White et al. ebenfalls kein CD82 exprimieren (White et al., 1998). Auch in HeLa-Zellen führt die Transfektion von C33 zu

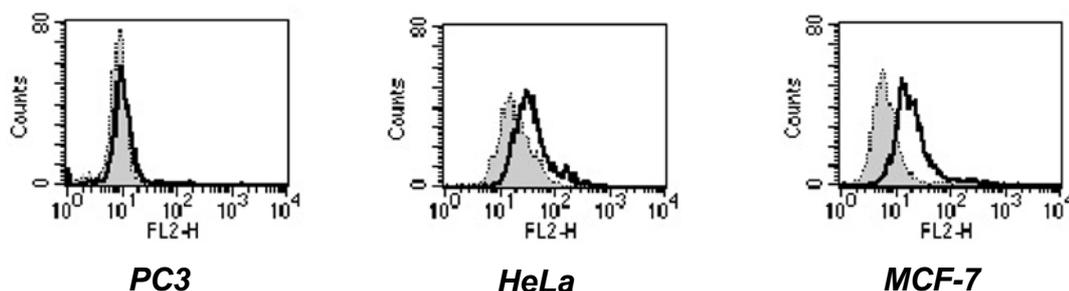


Abbildung 4.14 Expressionsniveau von CD82 in unbehandelten PC3-, HeLa- und MCF-7-Zellen

PC3-Zellen exprimieren nahezu kein, HeLa-Zellen etwas und MCF-7-Zellen relativ viel CD82. Die Messung erfolgte durchflusscytometrisch nach Anfärbung mit einem Phycoerythrin-konjugierten anti-CD82-Antikörper. Aufgetragen wurde die Zahl der Zellen (*counts*) gegen die Fluoreszenz im Kanal FL2. Die grau unterlegten Kurven spiegeln die Eigenfluoreszenz nicht-antikörperexponierter Zellen wieder, die schwarzen dicken Linien geben die Häufigkeitsverteilungen antikörper-gefärbter Zellen an. Von der Differenz zwischen beiden Verteilungen kann auf das Maß der CD82-Exposition an der Zelloberfläche geschlossen werden.

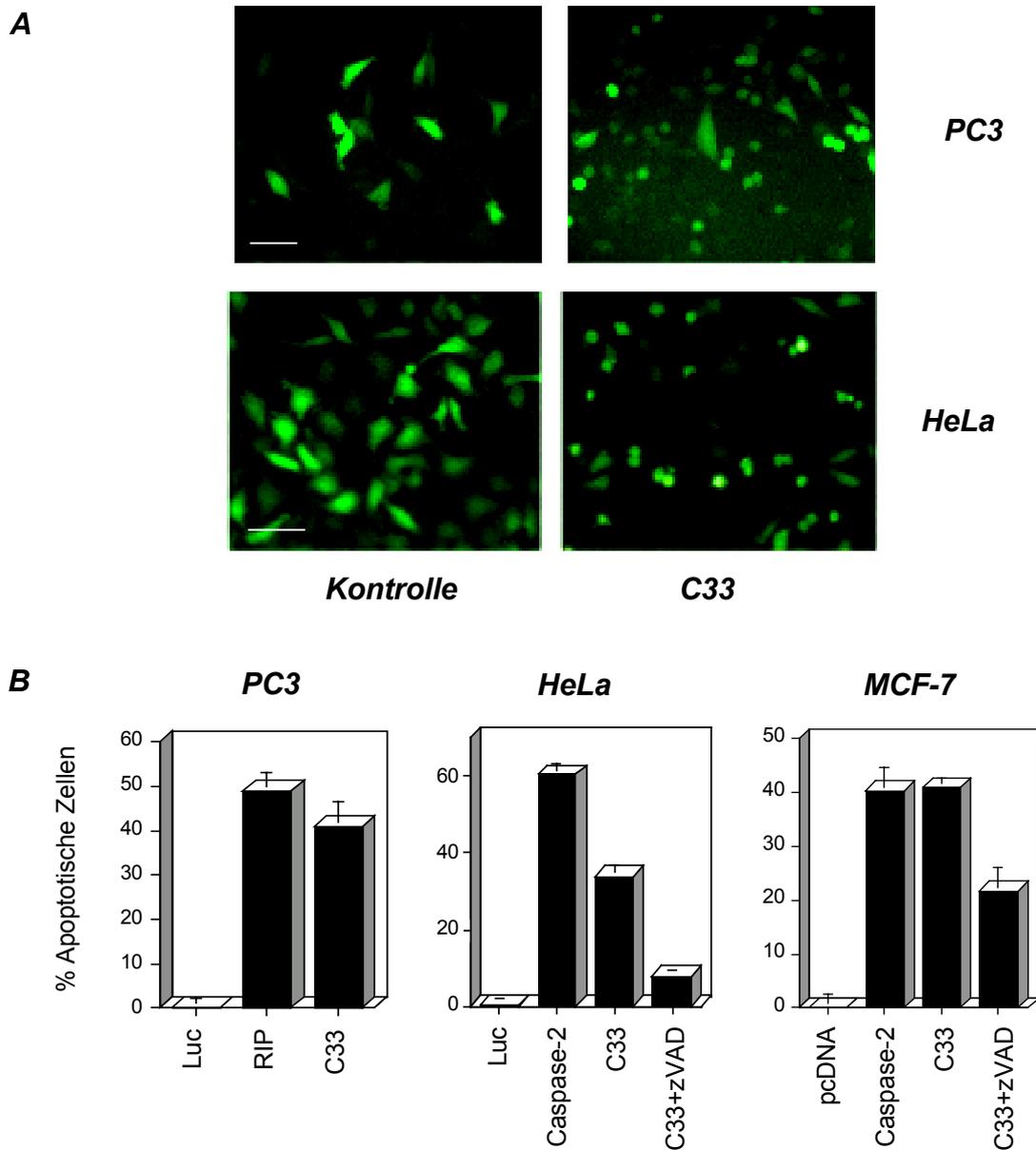


Abbildung 4.15 Apoptoseinduktion in Prostata-, Cervix- und Mammakarzinomzelllinien

(A) Die Transfektion von C33 induziert Apoptose-typische morphologische Veränderungen: Zellen der Prostatacarcinom-Zelllinie PC3 runden sich ab. HeLa-Zellen bilden zudem apoptotische Körperchen, wohingegen die kontrolltransfizierten Zellen keinerlei morphologische Veränderungen zeigen. PC3-Zellen wurden transfiziert mit 2,5 µg Vektor für C33 bzw. Luciferase sowie 2,5 µg pEGFP, HeLa-Zellen mit 0,7 µg Expressionsvektor und 0,4 µg pEGFP. Die Transfektionen erfolgten im 12-well-Format mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode. Die Zellen wurden 30 h (PC3) bzw. 22 h (HeLa) nach Transfektion im Fluoreszenzlicht photographiert. Die Länge der Balken entspricht jeweils 100 µm. (B) C33 induziert 34 bis 41 % Apoptose in PC3-, HeLa- und MCF-7-Zellen. Diese lässt sich in HeLa- und MCF-7-Zellen durch den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD zu 77 bzw. 47 % hemmen. PC3- und HeLa-Zellen wurden wie in (A) transfiziert,

MCF-7-Zellen wurden mit 3 µg Expressionsplasmid und 3 µg pEGFP im 24-well-Format transfiziert. Als Positivkontrollen wurden RIP bzw. Caspase-2 verwendet. HeLa und MCF-7 wurden zudem mit zVAD behandelt (50 bzw. 45 µM, Zugabe 13 bzw. 11 h nach Transfektion). Die Quantifizierung erfolgte 30, 22 bzw. 26 h nach Transfektion durch Auszählen von wenigstens 130 Zellen/Zählung im Fluoreszenzlicht. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Zählungen.

zahlreichen apoptotischen Veränderungen: zur Bildung apoptotischer Körperchen, die sich durch den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD inhibieren lässt (Abbildung 4.15 A, B) oder zur bereits erwähnten Spaltung von PARP oder der Degradation der chromosomalen DNA (vgl. Abschnitt 4.2). Auch in MCF-7-Zellen, deren endogenes CD82 von den getesteten Zelllinien am stärksten exprimiert ist, induziert die Transfektion von C33 Apoptose, die sich durch den Pan-Caspase-Inhibitor zVAD signifikant, um 47 %, hemmen lässt. Während C33 in HeLa-Zellen etwas weniger Apoptose als die als Positivkontrolle transfizierte Caspase-2 induziert, induzieren in MCF-7-Zellen beide Proteine in vergleichbarem Umfang Apoptose. Dass die Überexpression von C33/CD82 in all diesen Zelllinien Apoptose induziert, deutet zudem darauf hin, dass in diesen Zellen der CD82-nachgeschaltete Signaltransduktionsweg, der zur Apoptose führt, intakt sein muss – möglicherweise deshalb, weil er für andere zentrale Vorgänge innerhalb der Zelle benötigt wird. Um zu sehen, ob bereits die Menge an CD82, das endogen, d.h. ohne Überexpression oder spezielle Induktion, in der Zelle vorhanden ist, für die Zelle in bestimmten Situationen kritisch ist, wurden CD82-defiziente PC3-Zellen und eine entsprechende rekonstituierte PC3-Zelllinie hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen proapoptotischen Stimuli verglichen (siehe Kapitel 4.4.2).

4.4.2 C33/CD82 sensitiviert Prostatakarzinomzellen für Cycloheximid-induzierte Apoptose

Nachdem die proapoptotische Wirkung von überexprimiertem C33/CD82 in verschiedenen Tumorzelllinien gezeigt war, war es von Interesse zu klären, ob auch die normale in Tumorzellen vorhandene CD82-Menge einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber Apoptose hat. Aus diesem Grund wurden PC3-Zellen, die kein endogenes CD82 exprimieren (siehe Abbildung 4.14), stabil mit CD82 transfiziert. Dabei wurden drei unabhängige Klonpools generiert: sie alle exprimieren CD82, wie dem in Abbildung 4.16 A abgebildeten Western-Blot zu entnehmen ist. Die zusätzlich durchgeführte durchflusscytometrische Quantifizierung der CD82-Expression (Abbildung 4.16 B) ergab, dass die CD82-rekonstituierten Zelllinien, im Gegensatz zu der als Kontrolle nur mit pcDNA3 transfizierten Zell-

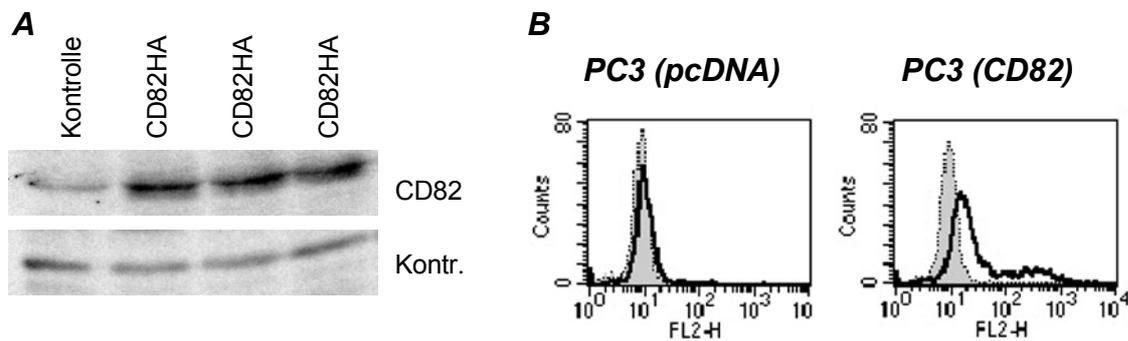


Abbildung 4.16 CD82-Expression in stabil transfizierten PC3-Zellen

(A) Western-Blot: CD82-HA wird in allen drei stabil transfizierten PC3-Klonpools exprimiert und hat ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa, was auf eine Glykosylierung des 29,6 kDa großen Proteins hindeutet. Dagegen ist nur eine schwache Bande in dem als Kontrolle mit pcDNA3 transfizierten Klonpool zu sehen. Als Ladekontrolle wurde eine unspezifische Bande („Kontr.“) mit abgebildet. Die Zellen einer 10 cm-Schale wurden zunächst lysiert und zentrifugiert. Je 40 µg der Membranproteinfraktion wurden auf einem 10 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet, bevor die CD82-Bande mit Hilfe eines monoklonalen anti-HA-Antikörpers und einer Chemilumineszenzreaktion visualisiert wurde. (B) Durchflusscytometrischer Nachweis der CD82-Expression: Zellen der in (A) beschriebenen Klonpools wurden mit einem Phycoerythrin-gekoppelten anti-CD82-Antikörper inkubiert, durchflusscytometrisch analysiert (schwarzer Kurvenverlauf) und mit unbehandelten Zellen (graue Häufigkeitsverteilung) verglichen. Aufgetragen ist jeweils die Häufigkeit (*counts*) von Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal FL2. Die Differenz zwischen den beiden Kurven eines Diagramms zeigt an, dass kontrolltransfizierte PC3-Zellen nahezu kein CD82 exprimieren, während der hier exemplarisch gezeigte stabile Klon etwa soviel CD82 bildet, wie die in Abbildung 4.14 gezeigten unbehandelten MCF-7-Zellen.

linie, alle CD82 etwa im gleichen Umfang wie MCF-7-Zellen exprimieren (vgl. Abbildung 4.14).

Die so generierten Zelllinien wurden nun auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen proapoptotischen Stimuli getestet. Dies führte zu dem Ergebnis, dass die Expression von CD82 die Sensitivität der Zellen gegenüber Cycloheximid-induzierter Apoptose erhöht: Wie in Abbildung 4.17 A dargestellt, zeigen die getesteten Zelllinien ohne Cycloheximidbehandlung keine Unterschiede im Basalniveau der Apoptoseinduktion, während es in beiden getesteten CD82-exprimierenden Klonpools zu einer signifikanten, drei- bis viermal stärkeren Apoptoseinduktion nach Cycloheximidbehandlung als bei den mit pcDNA transfizierten Kontrollzellen kommt. Im Gegensatz dazu zeigten die CD82-exprimierenden Zellen kein anderes Verhalten gegenüber anderen proapoptotischen Stimuli, wie beispielsweise der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF α) oder gegenüber Puromycin, das wie Cycloheximid die Translation bei

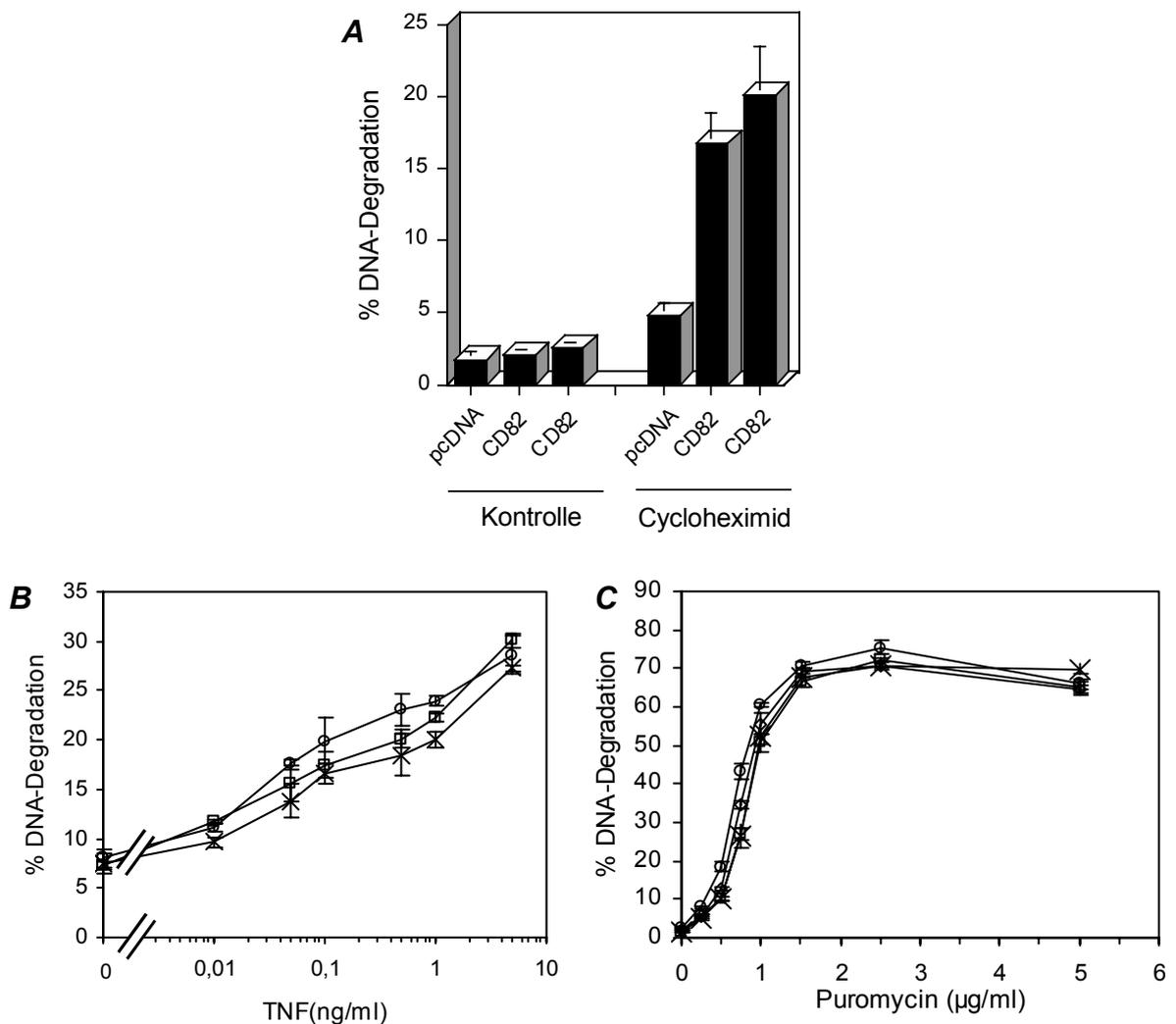


Abbildung 4.17 CD82 sensitiviert PC3-Zellen spezifisch für Cycloheximid-induzierte Apoptose

(A) In CD82 stabil exprimierenden Zellen induziert Cycloheximid DNA-Degradation in 17 bis 20 % der Zellen; dagegen zeigen nur 5 % der Zellen, die CD82 nicht exprimieren, bei Cycloheximidbehandlung die Apoptose-typische DNA-Degradation. Für das Experiment wurden zwei stabil CD82-exprimierende (CD82-rekonstituierte) Klonpools und als Kontrolle ein mit pcDNA-transfizierter Klonpool (vgl. Abbildung 4.16) getestet. Die Klonpools wurden für 30 h mit und ohne 0,25 µg/ml Cycloheximid (rechte bzw. linke Hälfte der Abbildung) kultiviert. Anschließend wurde der Anteil Zellen mit Sub-G1-DNA durchflusszytometrisch ermittelt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die nicht-Cycloheximid-behandelten Klonpools zeigen keine Unterschiede bezüglich der Apoptoseinduktion. (B,C) Die in (A) beschriebenen Klonpools unterscheiden sich nicht in ihrer Sensitivität gegenüber TNF (B)- und Puromycin (C)-induzierter Apoptose. Die unter (A) beschriebenen Klonpools wurden 45 h mit verschiedenen TNF α -Konzentrationen und 25 U/ml IFN γ (B) bzw. 31 h mit verschiedenen Puromycin-konzentrationen (C) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Mit \square wurden die Werte der pcDNA-transfizierten Klonpools dargestellt, mit anderen Symbolen die jeweils zwei (B) bzw. drei (C) getesteten CD82-positiven Klonpools.

der Proteinbiosynthese der Zellen inhibiert (Abbildung 4.17 B,C). Dabei waren die Konzentrationen so gewählt, dass eine Steigerung der Apoptose im linearen Bereich der beiden Kurven, bei TNF im Bereich zwischen 0,01 und 5 ng/ml und bei Puromycin im Bereich zwischen 0,25 und 1 µg/ml, durchaus detektierbar gewesen wäre. Auch hinsichtlich der Sensitivität gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Cytostika wie Actinomycin D, welches die Transkription inhibiert, Etoposid, einem Inhibitor der Topoisomerase II, der zur Aktivierung von p53 führt (Kaufmann et al., 1993), Arsentrioxid, das zur Zerstörung von Kernstrukturen führt (Muller et al., 1998), und dem anti-Fas-Antikörper, der rezeptorvermittelt Apoptose induziert (vgl. Abschnitt 1.2.1), konnten keine Unterschiede zwischen den CD82-positiven und negativen Zelllinien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass CD82 sich synergistisch mit dem proapoptotischen Stimulus Cycloheximid verhält, während zahlreiche andere proapoptotische Signaltransduktionswege von der CD82-Expression unbeeinflusst bleiben.

4.4.3 C33/CD82 induziert Apoptose unter moderat hypoxischen Bedingungen

Wie bereits in Abschnitt 1.5.2 erwähnt, kann die Expression von C33/CD82 durch Transkriptionsfaktoren gesteigert werden, wodurch die Proteinmenge in der Zelle auf ein Niveau steigen könnte, das ebenso wie Überexpression des Proteins Apoptose induziert. Zu den Faktoren, die die Transkription von CD82 fördern, gehören der Hypoxie-aktivierbare Transkriptionsfaktor NF-IL-6 und p53, welches ebenfalls verstärkt unter hypoxischen Verhältnissen gebildet wird (Graeber et al., 1996; Yan et al., 1997). Da die Menge an Sauerstoff für eine heranwachsende Metastase bis zum Einsetzen der Vaskularisierung limitierend ist und die Expression von C33/CD82 nachgewiesenermaßen die Metastasierung supprimiert (vgl. Abschnitt 1.5.1), wäre es denkbar, dass die durch die hypoxischen Verhältnisse bedingte verstärkte C33/CD82-Expression die Zellen in die Apoptose treibt und auf diese Weise die Metastasierung verhindert, so dass nur Zellen mit herabregulierter CD82-Expression Metastasen ausbilden können. Um diese Hypothese zu testen, wurde geprüft, ob C33/CD82 auch unter moderat hypoxischen Verhältnissen, wie sie in einer heranwachsenden Metastase gegeben sind, Apoptose induzieren kann.

Hierzu wurden HeLa-Zellen in einer Atmosphäre mit 1 % Sauerstoff inkubiert und mit C33 transfiziert: Wie in Abbildung 4.18 dargestellt, induziert C33 unter diesen Bedingungen in 25 % der Zellen Apoptose. Das bedeutet, dass C33/CD82 auch unter moderat hypoxischen Bedingungen als Apoptose-Induzierer aktiv ist und damit nach Aktivierung durch die

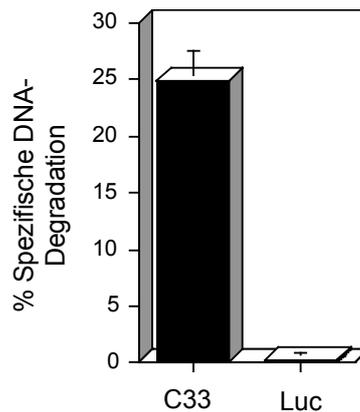


Abbildung 4.18 C33 induziert Apoptose unter hypoxischen Bedingungen

25 % der bei 1 % Sauerstoff kultivierten HeLa-Zellen zeigen DNA-Degradation mit C33. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Dazu wurden 100 ng Expressionsplasmid für C33 sowie für Luciferase als Negativkontrolle mit 25 ng pEGFP, das als Transfektionskontrolle diente, mit Effectene im 12-*well*-Format transfiziert. Die Zellen wurden während dieser Zeit in einer Atmosphäre mit 1 % Sauerstoff inkubiert und anschließend durchflusscytometrisch analysiert.

Transkriptionsfaktoren p53 und NF-IL-6 das Heranwachsen nicht-vaskularisierter Metastasen verhindern könnte.

4.5 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bei der C33/CD82-induzierten Apoptose

4.5.1 Im Verlauf der C33/CD82-induzierten Apoptose werden reaktive Sauerstoffintermediate gebildet

Da C33/CD82 transkriptionell von p53 aktiviert werden kann und p53 nach Untersuchungen von Li et al. Apoptose induziert, die durch reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) vermittelt wird (Li et al., 1999; Polyak et al., 1997), stellte sich die Frage, ob die C33/CD82-induzierte Apoptose auch durch Bildung von Sauerstoffintermediaten erfolgt. Um dies zu testen, wurden HeLa-Zellen mit Expressionsplasmiden für C33 und p53 transfiziert: In beiden Fällen konnte – im Vergleich zu Luciferase-transfizierten Kontrollzellen – die Bildung von Superoxidanionen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4.19): Diese erreichte mit C33 22 h nach Transfektion ein Maximum, während p53-transfizierte Zellen erst 27 h nach Transfektion ein Maximum zeigten. Diese zeitliche Abfolge könnte darauf hindeuten, dass

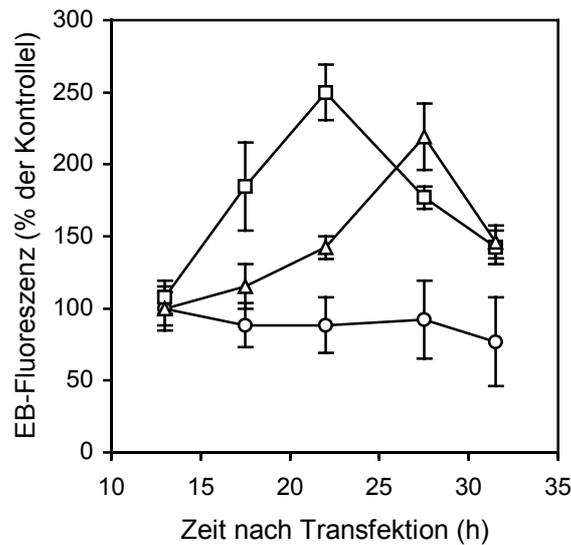


Abbildung 4.19 C33 vermittelt die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten

C33 (□) induziert die Oxidation von Hydroethidin zu Ethidiumbromid (EB). Auch transfiziertes p53 (△) führt zu einem Anstieg der EB-Fluoreszenz. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. Verwendet wurden Aliquots der bereits in Abbildung 4.3 (B und C) beschriebenen HeLa-Zellen, die mit Expressionsplasmiden für C33, p53 und Luciferase (○) transfiziert wurden. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit Hydroethidin inkubiert, welches durch Superoxidradikale zu Ethidiumbromid (EB) oxidiert wird. Dieses interkaliert in die DNA der Zellen und ermöglicht so den durchgeführten durchflusscytometrischen Nachweis der kurzlebigen Superoxidradikale. Die Messung wurde normalisiert auf den Prozentsatz der Fluoreszenzintensität, der mit Luciferase-kontrolltransfizierten Zellen bei der ersten Messung ermittelt wurde. Die Superoxidradikalproduktion der kontrolltransfizierten Zellen änderte sich im Verlauf der Zeitreihe nicht signifikant.

die durch Einwirkung von C33 gebildeten ROI zu der mit p53 beobachteten ROI-Bildung beitragen könnten, auch wenn zu der p53-induzierten ROI-Bildung auch andere Zielgene von p53, beispielsweise Bax oder PIG3, beitragen können (Miyashita und Reed, 1995; Sionov und Haupt, 1999). In jedem Fall ist jedoch aus Abbildung 4.19 abzuleiten, dass nach der Transfektion von C33 reaktive Sauerstoffintermediate in signifikantem Umfang gebildet werden. Da die Einwirkung von Sauerstoffradikalen beispielsweise durch Aktivierung der mitochondrialen PT-Pore Apoptose induzieren kann (vgl. Abschnitt 1.2.2), sollte durch die Verwendung von Antioxidanzien und ROI-inaktivierenden Enzymen geklärt werden, ob die ROI-Bildung für die C33/CD82-induzierte Apoptose essentiell ist.

Wie Abbildung 4.20 A zeigt, kann die durch C33/CD82 induzierte Apoptose durch die Inkubation der Zellen mit dem Antioxidanz Tiron, das Superoxidanionen abfängt, um 33 %

vermindert werden. Auch durch die Coexpression von radikal-inaktivierenden Enzyme wie der Superoxid-Dismutase oder Katalase konnte die C33/CD82-induzierte Apoptose deutlich, nämlich um etwa 50 % reduziert werden (Abbildung 4.20 B). Diese Ergebnisse zeigen an, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate signifikant zur C33/CD82-induzierten Apoptose beiträgt, auch wenn zahlreiche andere Radikal-inaktivierende Substanzen, die ebenfalls eingesetzt wurden, die C33/CD82-induzierte Apoptose nicht reprimieren konnten.

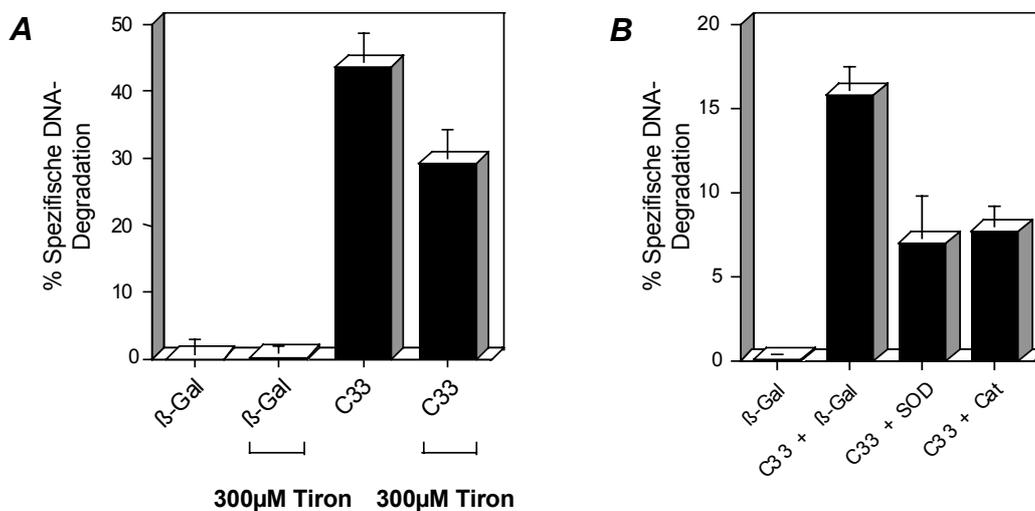


Abbildung 4.20 Sauerstoffradikal-inaktivierende Substanzen und Enzyme vermindern C33-Apoptose

(A) Die Inkubation mit dem Antioxidanz Tiron reduziert die durch C33 vermittelte Apoptose um 33 %, nämlich von 44 auf 29 %. Dahingegen bleibt das Apoptoseniveau in kontrolltransfizierten Zellen unbeeinflusst von der Tirongabe. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten. Dazu wurden HeLa-Zellen mit 100 ng eines Expressionsplasmids für C33 oder β -Galactosidase sowie 25 ng EGFP-Vektor im 12-*well*-Format mit Effectene transfiziert. Nach 13 h wurde 300 μ M Tiron zugesetzt, bevor nach 32 h die Zellen geerntet und durchflusscytometrisch analysiert (Sub-G1-DNA) wurden. Die Werte wurden normalisiert auf die mit cotransfiziertem EGFP ermittelte Transfektionseffizienz. **(B)** Die Cotransfektion von Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD) oder Katalase (Cat) senkt die C33-induzierte Apoptose von 16 auf 7 bzw. 8 %. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Experimenten mit HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit Effectene im 12-*well*-Format transfiziert mit 100 ng p β -Galactosidase, 50 ng pC33 und 50 ng p β -Galactosidase, 50 ng pC33 und 50 ng pSOD bzw. 50 ng pC33 und 50 ng pKatalase. Darüber hinaus wurden allen Ansätzen 25 ng pEGFP zugesetzt. 44 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, bevor durchflusscytometrisch der Anteil Zellen mit degradiertem DNA ermittelt wurde. Die erhaltenen Werte wurden auf die mit cotransfiziertem EGFP ermittelte Transfektionseffizienz normalisiert.

4.5.2 Die ROI-Bildung erfolgt unabhängig von der mitochondrialen Elektronentransportkette

Reaktive Sauerstoffintermediate werden normalerweise im Verlauf der Apoptose an der mitochondrialen Elektronentransportkette gebildet, da – bedingt durch die Freisetzung von Cytochrom c – anstelle von vier nur einzelne Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Cai und Jones, 1998). Dabei entstehen insbesondere Superoxidanionen, wie sie auch mit C33/CD82 detektiert wurden (vgl. Abbildung 4.19). Allerdings wurde im Fall von C33/CD82 die Bildung der reaktiven Sauerstoffintermediate bereits 18 h nach Transfektion beobachtet (vgl. Abbildung 4.19), also zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine

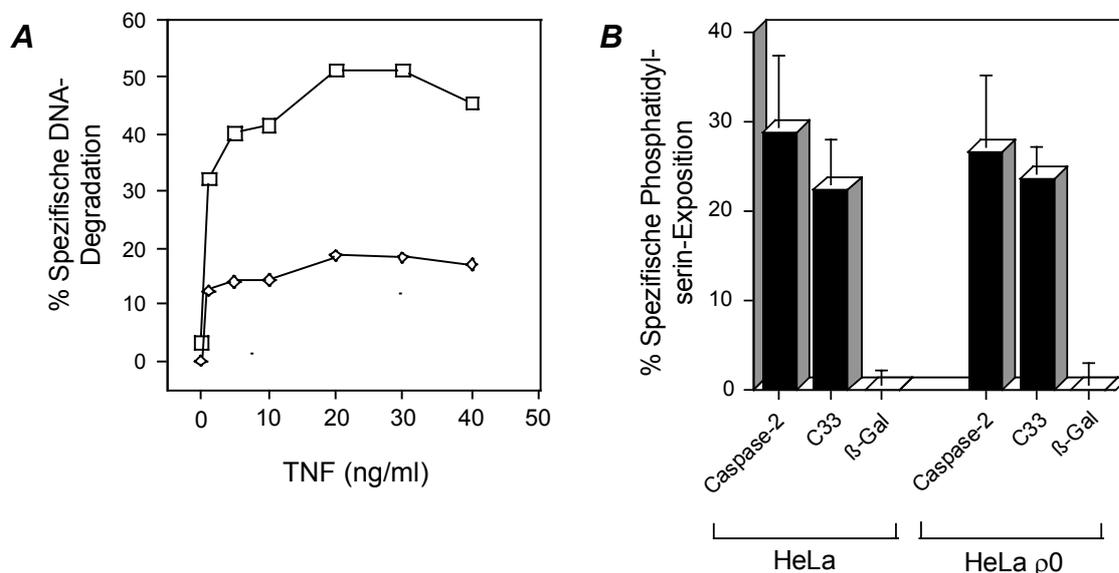


Abbildung 4.21 C33 initiiert Apoptose unabhängig von der Funktionalität der Atmungskette

(A) Wildtyp-HeLa-Zellen (\square) und HeLa-Zellen mit unvollständiger mitochondrialer Elektronentransportkette (HeLa $\rho 0$ -Zellen, \diamond) sind unterschiedlich sensitiv gegenüber $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Apoptose: Während DNA-Degradation in bis zu 51 % der Wildtyp-HeLa-Zellen zu beobachten ist, zeigen nur maximal 18 % der HeLa $\rho 0$ -Zellen diese apoptotische Veränderung. Die Zellen wurden für 45 h mit verschiedenen Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ und 25 U/ml $\text{IFN}\gamma$ inkubiert. Anschließend wurde der Anteil von Zellen mit degradiertem DNA durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Wildtyp-HeLa- und HeLa $\rho 0$ -Zellen zeigen nahezu gleiche Sensitivität gegenüber Caspase-2- und C33-induzierter Apoptose, gemessen als Anteil von Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin, nämlich im Mittel 27 bzw. 29 % bei Caspase-2 und 24 bzw. 23 % bei C33. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden im 12-well-Format mit Effectene und 100 ng eines Expressionsplasmids für Caspase-2, C33 oder β -Galactosidase sowie mit 25 ng eines EGFP-Vektors transfiziert. Nach 46 h wurde durchflusszytometrisch der Anteil Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin bestimmt. Die Werte wurden auf die mit cotransfiziertem EGFP bestimmte Transfektionseffizienz normalisiert.

Freisetzung von Cytochrom c beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 4.4 B). Aufgrund dieser Diskrepanz wurde geprüft, ob der mitochondriale Elektronentransport für die Entstehung der Sauerstoffintermediate verantwortlich ist. Hierzu wurden HeLa $\rho 0$ -Zellen verwendet, ein Derivat von HeLa-Zellen, deren mitochondriale DNA zerstört ist, so dass die Zellen über keine funktionelle mitochondriale Elektronentransportkette verfügen und damit auch auf diesem Weg keine Sauerstoffradikale generieren können (Buchet und Godinot, 1998; Chandel und Schumacker, 1999; Jiang et al., 1999). Daher sind HeLa $\rho 0$ -Zellen im Vergleich zu herkömmlichen HeLa-Zellen weniger sensitiv gegenüber Apoptosearten, die auf Mitochondrien als Verstärker des proapoptotischen Signals angewiesen sind, z.B. TNF α -induzierte Apoptose (Abbildung 4.21 A) (Chandel und Schumacker, 1999; Sidoti-de Fraise et al., 1998) oder durch verschiedene Cytostatika induzierte Apoptose (Jia et al., 1997). Im Gegensatz zu TNF-induzierter Apoptose zeigen sie die gleiche Sensitivität gegenüber C33/CD82- und Caspase-2-induzierter Apoptose wie herkömmliche HeLa-Zellen, nämlich

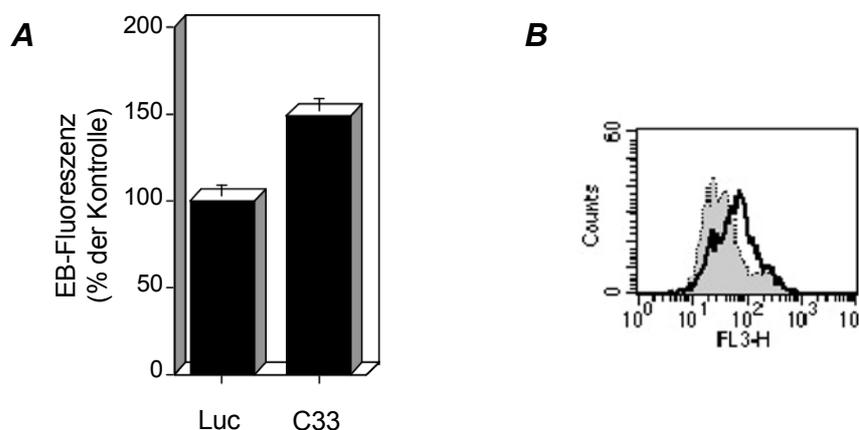


Abbildung 4.22 C33 induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten in HeLa $\rho 0$ -Zellen

(A) Auch in HeLa $\rho 0$ -Zellen führt die Transfektion von C33 zur verstärkten Oxidation von Hydroethidin zu Ethidiumbromid (EB): gemessen wurden 149 im Vergleich zu 100 % in der Kontrolle. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden im 12-well-Format transfiziert mit Effectene und 100 ng Expressionsplasmid für Luciferase bzw. C33 sowie mit 25 ng eines EGFP-Vektors. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, mit Hydroethidin inkubiert und durchflusscytometrisch untersucht (vgl. Abbildung 4.19). **(B)** Exemplarische Darstellung eines Originalhistogramms aus der unter (A) beschriebenen Messreihe. Aufgetragen ist die Zahl der gemessenen Zellen (*counts*) mit einer bestimmten Ethidiumbromid-Fluoreszenzintensität (FL3-H). Die graue Häufigkeitsverteilung wurde mit kontrolltransfizierten Zellen, die schwarze Verteilung wurde mit C33-transfizierten Zellen gemessen. Aus der Verschiebung des Maximums der schwarzen Verteilung hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten lässt sich auf eine verstärkte Superoxidradikalbildung in C33-transfizierten HeLa $\rho 0$ -Zellen schließen.

eine spezifische Apoptoseinduktion in 23 bzw. 24 % der mit C33 transfizierten Zellen. Dies bedeutet, dass im Fall von C33/CD82 der mitochondriale Elektronentransport – im Gegensatz zu anderen Fällen der Apoptoseinduktion – nicht für die ROI-Bildung verantwortlich ist, und das, obwohl wie in Kapitel 4.5.1 und Abbildung 4.20 gezeigt die ROI-Bildung signifikant zur Induktion der C33-Apoptose beiträgt. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass für die C33/CD82-induzierte Apoptose eine andere, vom mitochondrialen Elektronentransport verschiedene ROI-Quelle verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde geprüft, ob die Expression von C33/CD82 auch in HeLa $\rho 0$ -Zellen zur Bildung von Superoxidanionen führt: Wie in Abbildung 4.22 dargestellt, führt C33, im Gegensatz zur als Kontrolle transfizierten Luciferase, auch in HeLa $\rho 0$ -Zellen in signifikantem Umfang zur Bildung von Superoxidanionen. Dies bestätigt die Hypothese, dass die bei der C33/CD82-induzierten Apoptose beobachtete ROI-Bildung unabhängig von dem mitochondrialen Elektronentransport erfolgt und somit eine neue Möglichkeit der Apoptoseinduktion darstellt. Im Rahmen dieser kann es, auch in HeLa $\rho 0$ -Zellen, zur Aktivierung von Mitochondrien kommen, da selbst diese Zellen aufgrund der Aktivität der noch funktionellen F1-ATPase und der Adenin-Nukleotid-Translokase (Ant) über ein nahezu normales Membranpotential an der inneren Mitochondrienmembran verfügen (Buchet und Godinot, 1998; Chandel und Schumacker, 1999; Jiang et al., 1999), was durch eigene Messungen bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

5.1 Screening nach dominanten proapoptischen Genen

5.1.1 Neu-identifizierte proapoptische Gene

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 52 verschiedene Apoptose-induzierende Gene identifiziert, die in drei verschiedene Kategorien eingeteilt wurden (vgl. Abschnitt 4.1 ff.): „Bekannte Apoptoseinduzierer (Positivkontrollen)“, „Als proapoptisch identifizierte bekannte Gene“ (vgl. Tabelle 5.1) und „Uncharakterisierte Apoptose-induzierende Sequenzen“.

Lediglich eines der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Gene war bereits in der Literatur als proapoptisch beschrieben, nämlich der Zelltod-induzierende DFF45-ähnliche Effektor CIDE-A. Drei weitere bekannte Apoptoseinduzierer (CIDE-B, NIP-3 und FADD) wurden von anderen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts im Rahmen des Screenings isoliert (vgl. Abschnitt 4.1.1).

Von den 34 als proapoptisch identifizierten bekannten Genen konnten bereits 14 Gene – wie in Abschnitt 4.1.2 ausführlicher dargelegt – durch Auswertung der publizierten Literatur in Zusammenhang mit Krankheiten gebracht werden, zu deren Ätiologie die neu entdeckte proapoptische Fähigkeit der Gene beitragen könnte. So könnte beispielsweise die Adenin-Nukleotid-Translokase-1 (Ant1) bei Herzmuskelschwäche DCM zu einer erhöhten Apoptoserate führen. Eine Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten könnten ein Klon mit Homologie zu einem Presenilin-assoziierten Protein, die Kynurenin-3-monooxygenase sowie E25B spielen. In Zusammenhang mit neuromuskulären Veränderungen bzw. Muskeldystrophien könnte dagegen z.B. die Apoptoseinduktion durch Letm 1 und Synthrophin-1 relevant sein. Von besonderem Interesse sind auch die als Tumorsuppressoren beschriebenen Proteine H-rev 107 und CII-3 (eine Untereinheit des Komplexes II der Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase) sowie der Metastasensuppressor C33/CD82, der in dieser Arbeit genauer charakterisiert wurde. Weiterhin wurden der Parathyroidhormon (verwandte) Peptidrezeptor (PTH(r)R) und der spannungsabhängige Anionenkanal 2 (VDAC), der eine Komponente der mitochondrialen PT-Pore ist und bei der UV-induzierten Apoptose eine Rolle spielen könnte, isoliert. Weitere als proapoptisch identifizierte Klone sind die adulte Kette 1 von Hämoglobin- α sowie der Elongationsfaktor 2, die im Fall bestimmter β -Thalassämien bzw. bei der durch Bakterientoxine induzierten Apoptose relevant sein könnten.

Eine gewisse, aber akzeptable, Redundanz der Screeningergebnisse, die die Eignung der Methode unterstreicht, ist dadurch gegeben, dass Gene wie Ant1, PTH(r)R und CII-3 auch im Screening von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe isoliert wurden.

Tabelle 5.1 Übersicht über die als proapoptotisch identifizierten, aber bereits bekannten Gene

In der linken Hälfte der Abbildung sind als proapoptotisch isolierte bekannte Gene aufgeführt, deren proapoptotisches Verhalten nach Literaturrecherchen in Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten stehen könnte. Die rechte Hälfte der Abbildung umfasst alle weiteren als proapoptotisch isolierten bekannten Gene, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden. Für diese konnte bislang keine Krankheitsassoziation ermittelt werden. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Als proapoptotisch identifizierte bekannte Gene	
• Adenin-Nukleotid-Translokase-1 (Ant1)	• Calciumkanal-gamma 5 Untereinheit (CACNG5)
• Mitochondriales Transporter Homolog 1 Isoform a (MTCH) / Presenilin-assoziiertes Protein	• Putative Ca ²⁺ -transportierende ATPase
• Kynurenin3-monooxygenase	• Na ⁺ K ⁺ -transportierende ATPase, alpha 1 Polypeptid (Atp1a1)
• E25B	• Na/Pi-Cotransporter (NaPi-7)
• <i>Leucin-zipper-EF-hand</i> enthaltendes Transmembranprotein 1 (Letm1)	• Nieren-spezifischer Transporter (RST)
• Syntrophin-1	• Nieren-spezifisches Transportprotein
• H-rev107	• Innere mitochondriale Membrantranslokase Tim23
• Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase Komplex II, Membran-intrinsische Untereinheit (CII-3)	• Glucose-Transporter Isoform 1 (Glut-1)
• Cytochrom b kleine Untereinheit von Komplex II	• Fettsäuretransportprotein 2
• C33, Metastasensuppressor	• <i>Very-long-chain</i> Acyl-CoA-Synthetase (VLACS)
• Parathyroidhormon- (verwandter) Peptidrezeptor (PTHrR/PTHrR)	• <i>Medium-chain</i> Acyl-CoA-Dehydrogenase
• Spannungsabhängiger Anionenkanal-2 (VDAC)	• Cytochrom beta-558
• Hämoglobin- α , adulte Kette 1 (Hba-a1)	• Putatives Glykogen-Speicherkrankheit Typ 1b-Protein
• Elongationsfaktor 2 (EF-2)	• L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase
	• Shyc
	• Synaptisches Glykoprotein (SC2)
	• Serin-Threonin-Proteinkinase- 51PK / VRK1
	• Guanin-Nukleotid-Bindeprotein G-s, α - Untereinheit
	• Proteinphosphatase-1 γ (PP1c γ)
	• Osteopontin

Die zelluläre Funktion der übrigen 20 als proapoptotisch identifizierten bekannten Gene ist ebenfalls weitgehend bekannt, doch konnte aufgrund des derzeitigen Wissensstandes bislang kein Zusammenhang zwischen dieser und der neu entdeckten proapoptotischen Fähigkeit hergestellt werden (vgl. Abschnitt 4.1.2). Zu dieser Untergruppe zählen Transportproteine und Proteine des Fettsäure- und des Kohlenhydratstoffwechsels sowie zwei nahezu uncharakterisierte Proteine: Shyc und das synaptische Glykoprotein. Weiterhin fällt in diese Untergruppe ein Fragment der Serin-Threonin-Proteinkinase 51PK, das eines der seltenen Beispiele dafür ist, dass auch Kinasen bei der Apoptoseregulation eine Rolle spielen können. Darüber hinaus wurden ein Klon mit Homologie zu der α -Untereinheit des Guanin-Nukleotid-Bindeproteins G-s, einer mit Homologie zur Proteinphosphatase-1c und ein Klon, der weitgehend mit Ostoepontin übereinstimmt, als proapoptotisch identifiziert.

Ausserdem wurden im Rahmen dieser Arbeit 17 Gene isoliert, deren Funktion noch völlig unbekannt ist und deren Sequenzen lediglich im Rahmen von Sequenzierprojekten ermittelt wurden (vgl. Abschnitt 4.1.3). Sie könnten sich, sobald weitere Informationen über sie vorliegen als äußerst interessant erweisen.

Wie diese Zusammenstellung der Ergebnisse des Screenings zeigt, wurden mit Hilfe des verwendeten Screeningsverfahrens eine Reihe proapoptotischer Klone isoliert, die eine Rolle bei der Apoptoseinduktion sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen spielen können. Das bedeutet, dass das Screeningverfahren prinzipiell dazu geeignet ist, um einerseits neue Einblicke in das noch sehr unvollständige Netzwerk von unter physiologischen Bedingungen aktiven proapoptotischen Genen zu geben und um andererseits zum Verständnis bestimmter Krankheiten beizutragen, für deren Entstehung die neu entdeckte proapoptotische Fähigkeit eines Genes von Bedeutung sein könnte.

5.1.2 Vergleich mit alternativen Screeningmethoden

Das in dieser Arbeit verwendete, von Grimm und Leder entwickelte Expressions-Screeningverfahren (Grimm und Leder, 1997) basiert auf der Isolation einzelner Plasmid-DNA-Klone einer cDNA-Genbank im 96-*well*-Maßstab (Neudecker und Grimm, 2000) und deren anschließender Transfektion in 293T-Zellen im 24-*well*-Maßstab. Nach 20 bis 50 h wird das Apoptoseinduktionspotential der einzelnen cDNAs anhand phänotypischer Veränderungen mikroskopisch detektiert. Grundlage des Verfahrens ist das Phänomen, dass nahezu jedes in die Apoptoseinduktion involvierte Gen in der Lage ist, bei Überexpression selbst Apoptose zu induzieren. Ursache hierfür dürften durch die Überexpression hervorgerufene Protein-Protein-Interaktionen sein, die zur Aktivierung nachfolgender

Komponenten der proapoptotischen Kaskade führen. Eine Variante dieses Verfahrens stellt die von Ziauddin und Sabatini beschriebene Methode dar (Ziauddin und Sabatini, 2001): Dabei wird DNA einer cDNA-Bibliothek auf Mikroarrays aufgetragen und mit Zellen überschichtet, die diese aufnehmen und je nach Art des Klonen apoptotisch werden. Inwieweit sich diese Methode als praktikabel oder aufgrund der geringen verwendeten Zellzahlen als problematisch erweist, wird sich noch zeigen.

Das in dieser Arbeit verwendete Expressionsscreening-Verfahren erlaubt durch die Anwendbarkeit als Hochdurchsatzverfahren – insbesondere in vollständig automatisierter Form – die Überprüfung einer großen Anzahl von Kandidatengen und sogar vollständiger Genbanken. Im Gegensatz zu Verfahren, die auf dem Vergleich der differentiellen Genexpression in mit Apoptose-Induzierern behandelten und unbehandelten Zellen basieren, erlaubt es zudem die direkte Herstellung eines kausalen Zusammenhangs zwischen transfizierter cDNA und der Funktion der Apoptoseinduktion, weil die Apoptoseinduktion unmittelbar als Auswahlkriterium herangezogen wird.

Vergleicht man das Verfahren mit sogenannten Selektionsstrategien, wie sie beispielsweise von Kimchi et al. beschrieben wurden, ergeben sich Vor- und Nachteile (Levy-Strumpf und Kimchi, 1998). Diese Selektionsverfahren basieren auf der Transfektion einer *antisense*-cDNA-Bibliothek in eine Zelllinie und der anschließenden Applikation eines Apoptose-induzierers, beispielsweise IFN- γ . Aus den Zellen, die diese Behandlung (Selektion) überstehen, kann nun die transfizierte Plasmid-DNA isoliert und sequenziert werden. Dieses Verfahren hat gegenüber dem im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Expressionsscreening-Verfahren den Vorteil, dass nur solche Gene isoliert werden, die in Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion durch den gewählten Stimulus stehen. Somit kann im fortgeschrittenen Stadium u.U. ein funktioneller Zusammenhang zwischen den verschiedenen isolierten Klonen hergestellt werden, der einem proapoptotischen Signaltransduktionsweg entspricht. Dies bedeutet zugleich, dass mit diesem Selektionsverfahren lediglich proapoptotische Komponenten isoliert werden können, die dem applizierten proapoptotischen Signal nachgeschaltet sind. Im Gegensatz dazu ist mit Hilfe des Expressionsscreening-Verfahrens dieser Arbeit die Isolation proapoptotischer Komponenten bislang unbekannter apoptotischer Signaltransduktionswege möglich. Darüber hinaus werden bei dem Verfahren von Kimchi et al. lediglich solche Apoptose-inhibierende *antisense*-Klone isoliert, deren Funktion nicht durch alternative Signalwege umgangen werden kann, ein Problem, das angesichts der Redundanz der apoptotischen Signaltransduktion nicht zu vernachlässigen ist. Diese Problematik tritt bei dem in dieser

Arbeit verwendeten Expressionsscreening-Verfahren nicht auf, weil dieses – im Gegensatz zu dem Verfahren von Kimchi et al. – nicht auf einer Inhibition, sondern mit der dominanten Induktion von Apoptose auf einer positiven Wirkung basiert. Bei diesem Expressionsscreening-Verfahren ist daher auch die Detektion schwächerer proapoptotischer Klone möglich, die vielleicht nur unter besonderen Umständen, beispielsweise bei bestimmten Krankheitsbildern, *in vivo* relevant sind.

Gleich, mit welcher Methode neue Apoptose-induzierende Gene isoliert werden, müssen diese mit Hilfe von Recherchen in Literaturdatenbanken, Sequenzvergleichen und -analysen hinsichtlich ihrer physiologischen und pathologischen Relevanz bewertet werden. Je mehr Klone isoliert und charakterisiert werden, desto eher erhält man einen Überblick über die Vielfalt proapoptotischer Klone und desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, Klone zu isolieren, die sich als besonders interessant erweisen. Diese können anschließend hinsichtlich des Mechanismus' der Apoptoseinduktion und dessen Bedeutung für den programmierten Zelltod oder die Entstehung bestimmter Krankheiten genauer untersucht werden; mit dem Fernziel, ein besseres Verständnis des apoptotischen Signalnetzwerkes zu entwickeln und möglicherweise einen Beitrag zur Entwicklung einer Therapie bestimmter Krankheiten zu leisten. Ein Beispiel hierfür ist die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Apoptoseinduktion des Metastasensuppressorgens C33/CD82.

5.2 C33/CD82 - Ein Metastasensuppressor induziert Apoptose

Die Entstehung von Tumoren kann durch Tumorsuppressorgene, die Entstehung von Metastasen durch spezielle Metastasensuppressorgene unterdrückt werden. Viele Apoptose-induzierende Gene sind Tumorsuppressoren, beispielsweise p53, DCC oder Apaf-1 (vgl. Abschnitt 1.4.2), und sind daher in bis zu 50 % der Tumore herabreguliert (Levine, 1997). C33/CD82, dessen proapoptotische Aktivität im Rahmen dieser Arbeit entdeckt wurde, ist nach der DAP-Kinase (Inbal et al., 1997) das zweite Metastasensuppressorgen, für das eine proapoptotische Aktivität nachgewiesen wurde. Bislang wurde die Metastasen-supprimierende Wirkung von C33/CD82, ebenso wie die vieler anderer Metastasen-suppressoren, vor allem auf eine Inhibition der Zellmigration zurückgeführt: eine Vorstellung, die *in vivo* bislang nicht belegt wurde und die aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu erweitern sein dürfte. C33/CD82 ist einer der am besten charakterisierten Metastasensuppressoren, dessen Expression nicht nur sehr häufig, z.B. in über 76 % der untersuchten Nicht-kleinzelligen-Lungenkrebstumore (Adachi et al., 1998),

sondern auch in Metastasen von wenigstens sieben Primärtumorarten herabreguliert ist (vgl. Abschnitt 1.5.1).

Wie die Schemadarstellung in Abbildung 5.1 zeigt, induziert die transiente Transfektion des im Screening isolierten Mausklons C33, ebenso wie die seines zu 76 % identischen humanen Homologs CD82/KAI1, in Säugerzellen Apoptose über den mitochondrialen Weg (vgl. Abschnitt 4.2.2): Es kommt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi$ und zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Cytoplasma. Demzufolge wird die Apoptose durch Überexpression der antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2 und Bcl-x_L zu 55 bzw. 100 % inhibiert. Die aus den Mitochondrien freigesetzten proapoptotischen Faktoren aktivieren im Cytoplasma – vermutlich vermittelt über Caspase-9 (vgl. Abbildung 1.3) – Effektorcaspasen. Dadurch kommt es zur Ausprägung typischer Kennzeichen der Apoptose: charakteristischen morphologischen Veränderungen, wie der Kondensation des Cytoplasmas und Bildung apoptotischer Körperchen, der Exposition von Phosphatidylserin, die im Körper die Erkennung und damit einhergehende „Entsorgung“ durch phagozytierende Zellen erlaubt, sowie der Degradation der chromosomalen DNA und Spaltung des Caspase-Substrates Poly-(Adenosindiphosphat-Ribose)-Polymerase PARP. Diese phänotypischen Veränderungen sind – wie in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben – durch Verwendung der Pan-Caspase-Inhibitoren zVAD und p35 sowie durch das Protein XIAP, welches spezifisch die Caspasen-9, -3 und -7 hemmt, inhibierbar. Auch wenn diese Hemmung vermutlich aufgrund experimenteller Randbedingungen nur partiell (zu 47 bis 77 %) erfolgt, bestätigt sie dennoch die Notwendigkeit der Caspase-Aktivierung für die durch C33/CD82 hervorgerufenen Veränderungen und beweist zusätzlich zu den oben genannten Charakteristika, dass es sich bei dem beobachteten Prozess um Apoptose und nicht um einen anderen Effekt, beispielsweise Nekrose, handelt.

Auf welche Weise erfolgt nun die proapoptotische Aktivierung der Mitochondrien? Es existieren Hinweise, die allerdings umstritten sind (Duriez et al., 2000; Jackson und Puisieux, 2000), dass C33/CD82 durch den Tumorsuppressor p53 transkriptionell aktiviert wird (Mashimo et al., 2000; Mashimo et al., 1998). Wie C33/CD82 induziert auch p53 Apoptose über den mitochondrialen Weg (Carson und Lois, 1995; Lane, 1992), wobei bei p53 die Bildung von Superoxidanionen zumindest unter bestimmten Bedingungen für die Apoptoseinduktion essentiell ist (Li et al., 1999; Polyak et al., 1997). Tatsächlich führt auch die transiente Expression von C33/CD82 zur Bildung von Superoxidanionen (vgl. Abschnitt

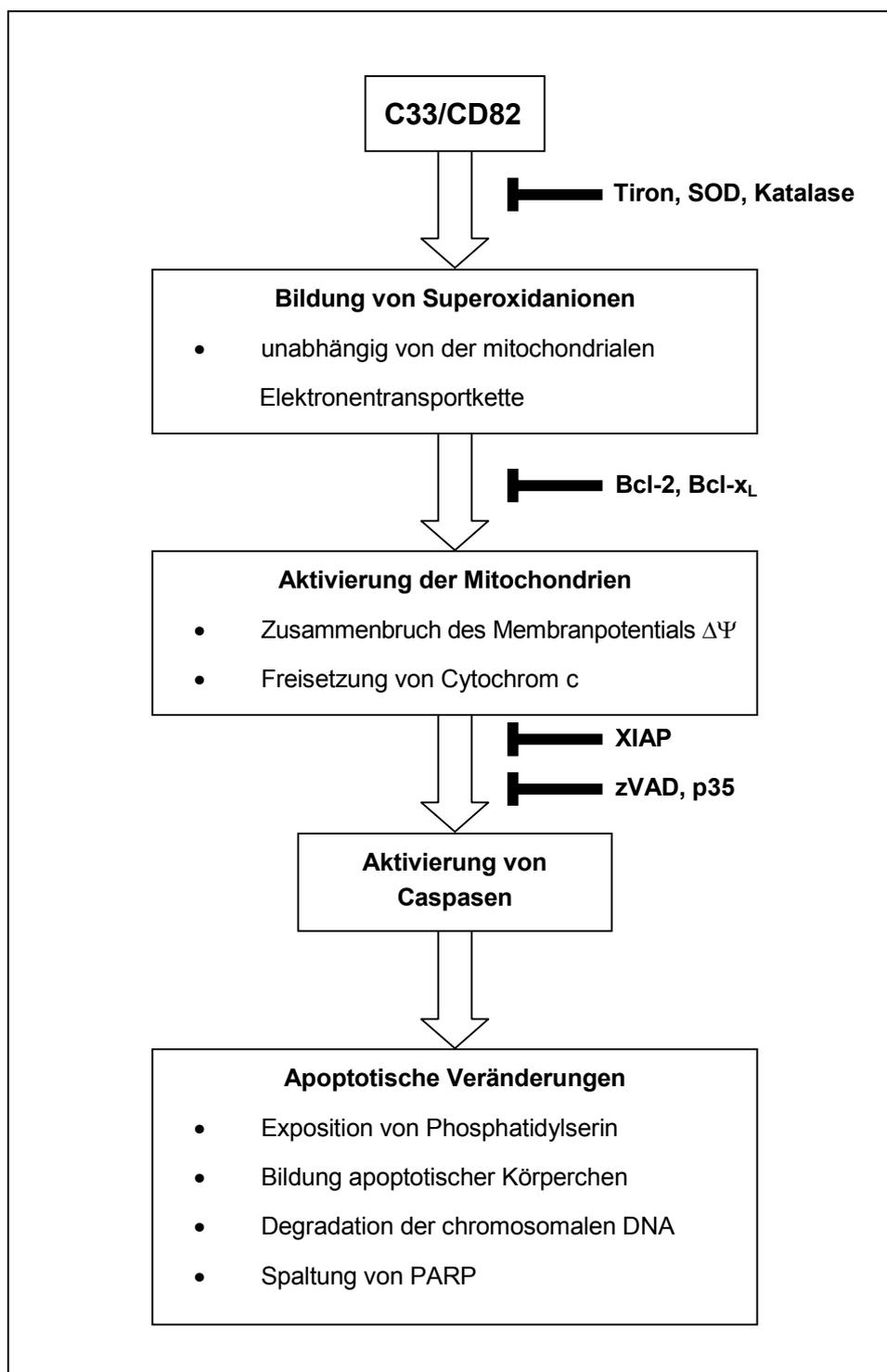


Abbildung 5.1 Postulierter Mechanismus der Apoptoseinduktion durch den Metastasensuppressor C33/CD82

Dieses Modell wurde aufgestellt aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Befunde: Infolge der transienten Expression von C33/CD82 kommt es zur Bildung von Superoxidanionen und zwar unabhängig von

der mitochondrialen Atmungskette; ein Prozess der sich durch die Antioxidanzien Tiron und die Radikal-inaktivierenden Enzyme Cu/Zn-Superoxiddismutase und Katalase hemmen lässt. Diese reaktiven Sauerstoff-intermediate führen zur Aktivierung der Mitochondrien (hemmbar durch antiapoptotische Bcl-2-Homologa) und induzieren dort den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c, die im Cytoplasma Effektor-Caspasen aktivieren. Die Aktivierung der Caspasen, die sich durch die Caspase-Inhibitoren p35, zVAD und XIAP hemmen lässt, führt zur Ausbildung der genannten apoptotischen Veränderungen.

4.5.1). Diese tragen signifikant zur C33/CD82-Apoptose bei, denn diese wird durch Verwendung des Superoxidanionen-inaktivierenden Antioxidanz' Tiron immerhin um 33 % und durch die Coexpression der Radikal-inaktivierenden Enzyme Superoxiddismutase und Katalase sogar um 50 % inhibiert.

Normalerweise entstehen Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) im Verlauf der Apoptose an der mitochondrialen Elektronentransportkette, wenn nach der Apoptose-bedingten Freisetzung von Cytochrom c anstelle der üblichen vier nun einzelne Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Cai und Jones, 1998). Im Gegensatz dazu werden die Superoxidanionen, die die C33/CD82-Apoptose auslösen, nicht an der mitochondrialen Elektronentransportkette gebildet, da C33/CD82 selbst in Zellen mit fehlendem mitochondrialem Elektronenfluss (ρ^0 -Zellen) (Buchet und Godinot, 1998; Chandel und Schumacker, 1999; Jiang et al., 1999) Superoxidanionen generiert und Apoptose induziert (vgl. Abschnitt 4.5.2). Und auch die oben erwähnte, mit Tiron, Superoxiddismutase und Katalase beobachtete Repression der Apoptoseinduktion bestätigt, dass die Bildung der reaktiven Sauerstoffintermediate vor der Aktivierung der apoptotischen Kaskade erfolgt. Wie und wo allerdings diese reaktiven Sauerstoffintermediate in der Zelle gebildet werden, bleibt zu klären. In Frage kommen beispielsweise Cytochrom-P450-Systeme, Oxidasen wie die NAD(P)H-Oxidasen oder weitere Radikal-generierende Enzymsysteme (Cross und Jones, 1991; Davydov, 2001). Somit handelt es sich bei der C33/CD82-Apoptose um eine neue, bislang nicht charakterisierte Art der Apoptoseinduktion durch reaktive Sauerstoff-intermediate, die nicht an der mitochondrialen Elektronentransportkette generiert werden (vgl. Abbildung 5.1). Diese führen dann, wie aus der Literatur mit H_2O_2 oder radikal-generierenden Substanzen bekannt, zur proapoptotischen Aktivierung von Mitochondrien. Jene erfolgt beispielsweise durch direkte Aktivierung der in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen PT(Permeabilitätsübergangs)-Poren (Cassarino und Bennett, 1999; Crompton, 1999; Loeffler und Kroemer, 2000) oder möglicherweise auch vermittelt durch Ceramid: Dieses könnte aufgrund der gestörten Redox-Verhältnisse an der Cytoplasmamembran durch

aktivierte Sphingomyelinasen generiert werden und kann ebenfalls die PT-Poren aktivieren (Bauer et al., 2000; Decaudin et al., 1998; Haimovitz-Friedman et al., 1994).

Dem Sauerstoffintermediat-abhängigen Mechanismus nach zu urteilen, ist es durchaus möglich, dass C33/CD82 zur p53-induzierten Apoptose beiträgt – neben anderen proapoptotischen und z.T. reaktive Sauerstoffintermediate generierenden Genen, die ebenfalls durch p53 aktiviert werden (Polyak et al., 1997). Weitere Argumente hierfür sind, dass die Superoxidanionproduktion mit transfiziertem C33/CD82 zeitlich früher als mit transfiziertem p53 einsetzt (vgl. Abbildung 4.19) und dass – nach Beobachtungen von Li et al. – auch bei der p53-Apoptose die Bildung von Superoxidanionen unabhängig von der Freisetzung von Cytochrom c erfolgt (Li et al., 1999). Möglicherweise spielt C33/CD82 unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise unter hypoxischen Verhältnissen (vgl. Abschnitt 5.4), sogar eine größere Rolle als andere Apoptose-induzierende p53-Zielgene, da z.B. Bax, obwohl es *in vitro* sehr stark Apoptose induziert, nur bei einigen Tumorarten zur p53-induzierten Apoptose beiträgt (McCurrach et al., 1997; Sionov und Haupt, 1999; Yin et al., 1997).

Wie Tests mit weiteren Mitgliedern der Tetraspanin-Superfamilie ergaben, induzieren neben C33/CD82 auch die Tetraspanine CD9, CD37, CD81 und CD151, sowie in geringerem Umfang auch CD53 und CD63 bei Überexpression Apoptose. Im Gegensatz dazu konnte für das Tetraspanin CO-029 keine proapoptotische Aktivität nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.3.2). Dies, und die Beobachtung, dass andere transient transfizierte Membranproteine ebenfalls keine Apoptose induzieren (Abschnitt 4.3.1), zeigt, dass die Apoptoseinduktion eine spezifische Eigenschaft ist, über die einige, aber nicht alle Tetraspanine verfügen. Wie C33/CD82 ist auch CD9, das auch als *metastasis-related protein* MRP-1 bezeichnet wird, in der Literatur als Metastasensuppressor bei verschiedenen Krebsarten beschrieben: Beispielsweise ist die Expression von CD9 in 36 % der Nichtkleinzelligen Lungenkrebs-Tumore und in 33 % der Brusttumore herabreguliert, die von CD82, welches etwas stärker als CD9 Apoptose induziert (vgl. Abbildung 4.8), sogar in 76 bzw. 60 % der Tumore. Im Gegensatz dazu war die Expression des fast keine Apoptose induzierenden Tetraspanins CD63 in keiner der untersuchten Tumorproben herabreguliert (Adachi et al., 1998; Huang et al., 1998). Diese Daten sowie die Erkenntnis, dass das nicht-proapoptotische Tetraspanin CO-029 die Metastasierung sogar fördert (Kanetaka et al., 2001), deuten auf eine Korrelation zwischen dem Apoptoseinduktionspotential und der Metastasen-supprimierenden Wirkung der einzelnen Tetraspanine. Derartige Korrelationen können immer nur tumorspezifisch erstellt werden, hier z.B. bezogen auf Brustkrebs oder

Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, da vereinzelte Publikationen dokumentieren, dass sich C33/CD82 nicht immer als Metastasensuppressor verhält: Unter bestimmten Bedingungen kann es die Metastasierung fördern, z.B. die bestimmter Lungenkrebszellen in SCID-Mäusen (Shinohara et al., 2001b) oder es wird bei bestimmten Leukämien verstärkt exprimiert (Burchert et al., 1999). Daher sind weitere, differenziertere Untersuchungen erforderlich. Diese erscheinen auch deshalb vielversprechend, weil die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs bei Expression von CD9 und CD82 bei 86 % liegt, während lediglich 31 % der Patienten überlebten, wenn keines der beiden Antigene exprimiert war, wobei die simultane Reduktion der CD9- und CD82-Expression sogar einen additiven Effekt auf das Metastasierungspotential hatte (Adachi et al., 1998). Auch wenn noch nicht geklärt ist, inwieweit die verschiedenen Eigenschaften der Tetraspanine zur Metastasensuppression beitragen, stellt die Entdeckung der Apoptoseinduktion von CD9, CD37, CD81, CD82 und CD151, sowie bedingt auch der von CD53, ein weiteres Argument für die Verwendung dieser Tetraspanine als prognostische Marker dar.

Da die Tetraspanine eine evolutionär alte Superfamilie sind (Boucheix et al., 2001), ist zu postulieren, dass die Apoptoseinduktion bei allen proapoptotischen Tetraspaninen auf gleiche Art und Weise erfolgt. Allerdings konnte weder durch Sequenzanalysen eine gemeinsame proapoptotische Region noch durch Recherche in der Literatur ein allen proapoptotischen Tetraspaninen gemeinsamer Interaktionspartner, der für die Apoptoseinduktion verantwortlich sein könnte, ausgemacht werden. Jedoch wurde durch das Testen der Apoptoseinduktion trunkierter Mutanten die für die Apoptoseinduktion relevante Region auf einen Bereich innerhalb der ersten 119 Aminosäuren eingegrenzt (vgl. Abbildung 4.9); also den Bereich vom N-Terminus bis zum Ende der dritten Transmembrandomäne. Dieser vermittelt weder die Interaktion mit Integrinen, die über die große extrazelluläre Schleife des Proteins erfolgt (Ono et al., 2000), noch sollte er zur beschleunigten Internalisierung des EGF-Rezeptors beitragen (Odintsova et al., 2000); allenfalls könnte er für die Interaktion mit Proteinkinasen vom PKC-Typ verantwortlich sein (Zhang et al., 2001). Daher erfolgt die C33/CD82-Apoptose vermutlich unabhängig von der Interaktionen mit Integrinen und dem EGF-Rezeptor – ein Aspekt der im folgenden Abschnitt detaillierter besprochen wird.

5.3 C33/CD82 hat wenigstens drei voneinander unabhängige metastasierungsrelevante Funktionen

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Apoptoseinduktion von C33/CD82 unabhängig von den anderen, in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des Proteins – der Beeinflussung der Zelladhäsion und -motilität sowie der beschleunigten Internalisierung des EGF-Rezeptors – erfolgt. Da die Relevanz dieser Eigenschaften für die Metastasierung bislang *in vivo* nicht nachgewiesen wurde (Afshari et al., 1999; Boucheix und Rubinstein, 2001; Mannion et al., 1996; Odintsova et al., 2000; Ono et al., 2000), könnte die C33/CD82-Apoptose ebenso wie die anderen Eigenschaften für die *in vivo* beobachtete Metastasen-suppression verantwortlich sein; insbesondere deshalb, da die Induktion von Apoptose ein kritischer Faktor bei vielen Schritten der Metastasierung ist, beispielsweise bei der Dissoziation und Dissemination von Tumorzellen sowie dem Metastasenwachstum (vgl. Abschnitt 1.4.1). Die durch C33/CD82 induzierte Apoptose wäre damit Teil der physiologischen Maschinerie des „Programmierten Zelltods“, die im Verlauf der Evolution entstanden ist und die den Körper vor schädlichen Entwicklungen, in diesem Fall vor der Bildung von Metastasen, schützt. Vermutlich handelt es sich bei der Apoptoseinduktion um eine Eigenschaft, die das Protein im Verlauf seiner Evolution zusätzlich zu seinen vielfältigen sonstigen Eigenschaften erworben hat.

Die in der Literatur beschriebenen Interaktionen von C33/CD82 mit Integrinen und dem EGF-Rezeptor legen eine Verbindung zwischen C33/CD82-Apoptose und durch Adhäsions- oder Wachstumsfaktorverlust induzierter Apoptose nahe. Jedoch konnte durch die Experimente dieser Arbeit, wie im Folgenden ausführlich dargelegt, gezeigt werden, dass die C33/CD82-Apoptose sehr wahrscheinlich unabhängig von den beiden Interaktionen erfolgt (vgl. Abbildung 5.2).

Integrine sind wichtige Zelladhäsionsmoleküle, die u.a. in fokalen Kontakten und in transienten protrusiven Strukturen wie Lamellipodien oder Filopodien zu finden sind, wo sie entscheidend die Migration der Zellen beeinflussen und mit C33/CD82 interagieren (Berditchevski und Odintsova, 1999). Mit C33/CD82 assoziiert sind außerdem Proteinkinase vom PKC-Typ, die, wenn sie durch C33/CD82 an Integrine herangeführt werden, diese phosphorylieren (Zhang et al., 2001). Integrine, die an die extrazelluläre Matrix assoziiert sind, vermitteln z.B. über Fokale Adhäsionskinase antiapoptotische Signale. Beim Verlust der Assoziation mit der extrazellulären Matrix, dem sogenannten Adhäsionsverlust, kommt es zur Induktion von Apoptose, die auch als Anoikis bezeichnet wird und die

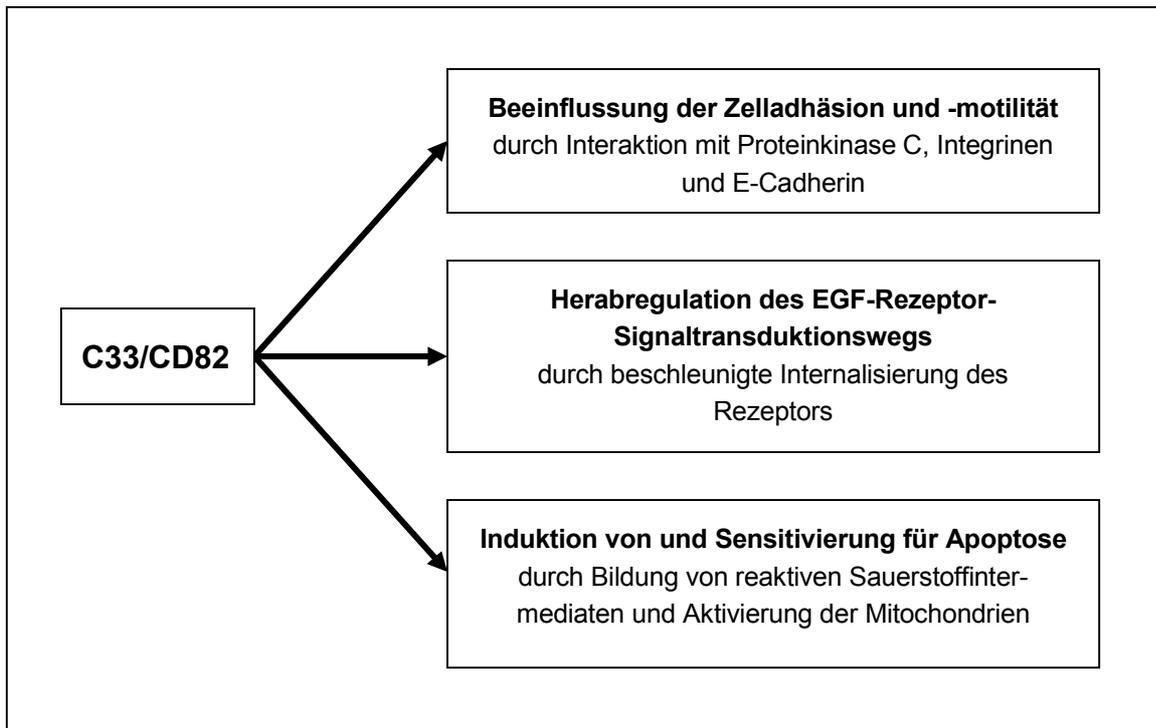


Abbildung 5.2 Übersicht über verschiedene potentiell metastasierungsrelevante Funktionen von C33/CD82

C33/CD82 beeinflusst *in vitro* die Zelladhäsion und -migration und erschwert so vermutlich die Dissoziation, Migration und Extravasation von Tumorzellen (Boucheix und Rubinstein, 2001; Mannion et al., 1996). Des Weiteren kann C33/CD82 die EGF-induzierte Signaltransduktion vermindern und auf diese Weise der Zelle wichtige Überlebenssignale entziehen (Odintsova et al., 2000). Als neue Funktion wurde im Rahmen dieser Arbeit die Fähigkeit von C33/CD82, dominant Apoptose zu induzieren und Zellen für Apoptose zu sensitivieren, entdeckt und charakterisiert. Diese drei Funktionen können theoretisch alle zur Metastasen-supprimierenden Eigenschaft von C33/CD82 beitragen und sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich voneinander unabhängige Eigenschaften des Proteins. Weitere Erläuterungen siehe Text.

wie die C33/CD82-Apoptose über den mitochondrialen Weg erfolgt (Evan und Vousden, 2001; Frisch und Ruoslahti, 1997; Frisch et al., 1996; Puthalakath et al., 2001). Theoretisch könnte auch die C33/CD82-Apoptose durch diesen Mechanismus erfolgen, indem beispielsweise überexprimiertes C33/CD82 die Integrine von ihren sonstigen Interaktionspartnern abschirmt und auf diese Weise die antiapoptotische Signaltransduktion der Integrine unterbindet. Tatsächlich ist aber die C33/CD82-Apoptose unabhängig von der Wechselwirkung des Proteins mit Integrinen, da die Mutante C33Δ119, der die große, die Interaktion mit Integrinen vermittelnde extrazelluläre Domäne fehlt (Ono et al., 2000), ebenso stark Apoptose induziert wie das Wildtypprotein C33/CD82 (vgl. Abschnitt 4.3.3).

Hinzu kommt, dass die Stärke der C33/CD82-Apoptose nicht durch Coexpression von ausgewählten mit C33/CD82 interagierenden Integrinuntereinheiten beeinflusst wird. Das dritte und entscheidende Argument für die Unabhängigkeit der C33/CD82-Apoptose-induktion von Integrinsignalwegen ist die Beobachtung, dass C33/CD82 Apoptose auch in nicht-adhärenen Zellen, also solchen, die weder mit Nachbarzellen noch mit einer extrazellulären Matrix interagieren, erfolgt (vgl. Abschnitt 4.3.6). Das bedeutet, dass der von C33/CD82 ausgehende proapoptotische Signalweg unabhängig von Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre Matrix-Kontakten ist und somit nicht auf Integrin- oder E-Cadherin-vermittelte Signale angewiesen ist, weil diese in diesen Suspensionszellen nicht bestehen. Demzufolge handelt es sich bei der C33/CD82-Apoptose um eine neue Eigenschaft des Moleküls, die sich von der durch Adhäsionsverlust induzierten Apoptose (Anoikis) abhebt. Des Weiteren unterscheidet sie sich auch von einer von Ono et al. beschriebenen, durch Migrationsinhibition induzierten Art der Apoptose, die 11 Tage nach Induktion der CD82-Expression als Folge der CD82-bedingten Inhibition der Migration beobachtet wurde (Ono et al., 1999). Sie erfolgte damit mit deutlich langsamerer Kinetik als die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene C33/CD82-Apoptose, die sich bereits 22 h nach Transfektion von C33/CD82 in Form phänotypischer Veränderungen, wie beispielsweise der Ausbildung apoptotischer Körperchen, manifestiert und unabhängig von migrationsinhibierenden Effekten ist.

Auch die Interaktion mit Proteinkinasen vom PKC-Typ scheint für die C33/CD82-Apoptose nicht relevant zu sein, da bei den verschiedenen auf Apoptoseinduktion getesteten Mitgliedern der Tetraspanin-Superfamilie keine Korrelation zwischen ihrer Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, und ihrer Eigenschaft, mit PKC zu interagieren, erkennbar ist (vgl. Abschnitt 4.3.5).

Auch die Interaktion von C33/CD82 mit dem EGF-Rezeptor ist vermutlich nicht die Ursache der C33/CD82-Apoptose: Nach Ergebnissen von Odintsova et al. beschleunigt C33/CD82 die Internalisierung des EGF-Rezeptors (Odintsova et al., 2000) und reguliert damit den EGF-Signalweg herab, der beispielsweise durch Stimulation der Transkription von Bcl-x_L Apoptose verhindert (Jost et al., 1999). Auf diese Weise könnte die Überexpression von C33/CD82 theoretisch zur Herabregulation von Bcl-x_L und damit zur Induktion von Apoptose führen. Die Resultate dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass dies nicht der Fall ist: Cotransfektionen des EGF-Rezeptors und seiner dominant-negativen Variante hemmen bzw. verstärken die C33/CD82-Apoptose nicht und Versuche mit trunkeerten Varianten von C33/CD82 demonstrieren, dass der das potentielle Internali-

sierungssignal enthaltende Teil von C33/CD82 nicht zur Apoptoseinduktion erforderlich ist. Des Weiteren konnte keine Korrelation zwischen der publizierten Interaktion der getesteten Tetraspanine mit dem EGF-Rezeptor und ihrer Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, aufgestellt werden (vgl. Abschnitt 4.3.4).

Demzufolge verfügt nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand C33/CD82 über wenigstens drei verschiedene Funktionen, die in Abbildung 5.2 dargestellt sind und die alle theoretisch zu der Eigenschaft des Proteins als Metastasensuppressor beitragen können: (a) die Beeinflussung der Zelladhäsion und -motilität, (b) die Herabregulation des EGF-Rezeptor-Signalweges und (c) eine proapoptotische Funktion, die in der Induktion von Apoptose bei Überexpression und der Sensitivierung für Apoptose bei normaler Expression von C33/CD82 besteht, welche in Abschnitt 5.4 ausführlicher beschrieben wird.

Einen Erklärungsansatz für die proapoptotische Aktivität von C33/CD82 könnte die kürzlich publizierte Beobachtung von Delaguillaumie et al. geben, dass Antikörper gegen CD82 zur Phosphorylierung von RhoGTPase-assoziierten Proteinen führen. Dadurch kommt es zur Aktivierung der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42, die charakteristische morphologische Veränderungen hervorrufen (Delaguillaumie et al., 2002). Es wäre denkbar, dass die Überexpression von C33/CD82 ähnlich wie die Überexpression anderer Zelloberflächenmoleküle, z.B. des TNF-Rezeptors, aktivierend wirkt. Durch C33/CD82 aktivierte RhoGTPasen könnten für die C33/CD82-Apoptose verantwortlich sein, da z.B. überexprimiertes Cdc42 selbst Apoptose induziert: Ursache hierfür ist die direkte Aktivierung des Jun N-terminale Kinase (JNK)-Signalwegs, die zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung von Bcl-2 führt (Sundaresan et al., 1996; Thomas et al., 2000). Ein weiterer Hinweis auf die Vermittlung der C33/CD82-Apoptose durch RhoGTPasen könnte sein, dass die RhoGTPase Rac eine Komponente des NADPH-Oxidasekomplexes ist, der Superoxidanionen generiert (Bishop und Hall, 2000; Knaus et al., 1998; Sundaresan et al., 1996). Dieser Komplex könnte für die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate nach Überexpression von C33/CD82 verantwortlich sein und insbesondere dann Apoptose auslösen, wenn der Bcl-2-Status der Zelle durch Cdc42 – welches ebenfalls durch C33/CD82 aktiviert wurde – erniedrigt ist. Inwieweit diese Modellvorstellung zutrifft und RhoGTPasen tatsächlich für die proapoptotische Wirkung von C33/CD82 verantwortlich sind, wird derzeit durch Experimente mit spezifischen Inhibitoren und dominant negativen Proteinen überprüft. Da bereits der Metastasensuppressor NM23 die Aktivität von RhoGTPasen reguliert (Otsuki et al., 2001) und auch die als Metastasensuppressorgen beschriebene Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase MKK4 durch RhoGTPasen aktiviert wird (Kim et

al., 2001b), würde eine Bestätigung der Beteiligung von RhoGTPasen an der C33/CD82-Apoptose auf eine allgemeine zentrale Rolle dieser GTPasen bei der Metastasierung deuten. Inwieweit die Apoptoseinduktion durch C33/CD82 auch in Tumorzellen und unter tumorartigen Bedingungen erfolgt und damit für die Metastasierung relevant sein kann, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

5.4 Die Bedeutung der C33/CD82-Apoptose für die Metastasierung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass C33/CD82 nicht nur in allen getesteten Tumorzelllinien bei Überexpression Apoptose induziert, sondern sich auch unter hypoxischen Bedingungen, die im Inneren von Tumoren und Metastasen herrschen und zur Hochregulation von C33/CD82 führen könnten, proapoptotisch verhält. Des Weiteren wurde demonstriert, dass bereits das normale Expressionsniveau von C33/CD82 Zellen gegenüber bestimmten proapoptotischen Stimuli sensitiviert. Diese Erkenntnisse und ihre Auswirkungen werden im Folgenden diskutiert.

Die Überexpression von C33/CD82 induziert in allen fünf getesteten Prostata-, Mamma- und Cervixkarzinom-Zelllinien Apoptose, und zwar unabhängig davon, ob die Zelllinien endogenes C33/CD82 exprimieren oder nicht (vgl. Abschnitt 4.4.1). Dies bedeutet, dass der von C33/CD82 ausgehende proapoptotische Signalweg in all diesen Zelllinien intakt ist und nicht durch antiapoptotische Mutationen, die Tumorzellen häufig im Verlauf ihrer Entstehung erwerben (vgl. Abschnitt 1.4.1), inhibiert ist. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass dieser Signalweg für andere Funktionen in der Zelle essentiell ist.

Die in den Experimenten durch transiente Transfektion bedingte Überexpression führt zu einer Expressionsstärke, die prinzipiell auch unter natürlichen Bedingungen im Organismus durch Aktivierung der C33/CD82-Expression erreicht werden könnte: wie in Abschnitt 1.5.2 dargelegt, kann die Expression von C33/CD82 durch NGF und NF κ B, aber auch durch Hypoxie-aktivierbare Transkriptionsfaktoren wie p53 und NF-IL-6, gesteigert werden. Weil die starke Expression von C33/CD82 auch unter moderat hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) Apoptose induziert – wie in dieser Arbeit durch transiente Transfektion demonstriert wurde (vgl. Abschnitt 4.4.3) –, könnte dieser Effekt auch zur *in vivo* beobachteten Metastasensuppression beitragen: Da im Inneren nicht-vaskularisierter Tumore und Metastasen bereits in etwa 100 μ m Distanz zu blutversorgenden Systemen hypoxische

Verhältnisse herrschen (Dang und Semenza, 1999; Hanahan und Weinberg, 2000), könnte es dort zur Aktivierung von p53 und NF-IL-6 kommen. Dies könnte zur transkriptionellen

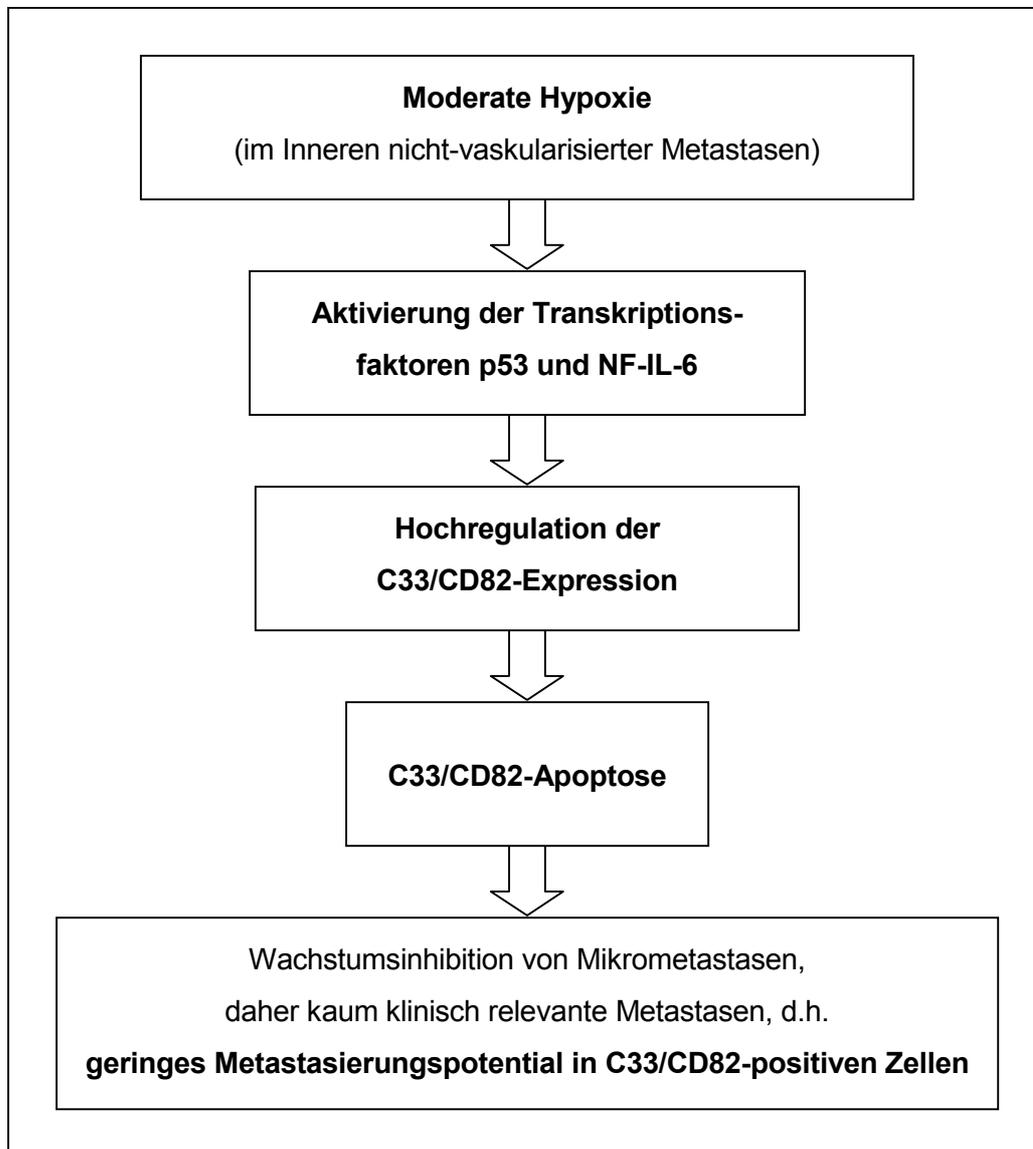


Abbildung 5.3 Modell der Bedeutung der C33/CD82-Apoptose unter hypoxischen Bedingungen für die Metastasierung

Unter moderat hypoxischen Bedingungen, wie sie im Inneren nicht-vaskularisierter Tumore und Metastasen herrschen, werden bestimmte Transkriptionsfaktoren hochreguliert, darunter p53 und NF-IL-6 (Graeber et al., 1996; Yan et al., 1997). Diese können wiederum die Expression von C33/CD82 hochregulieren (vgl. Abschnitt 1.5.2), welches, wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, bei entsprechender Expressionsstärke unter diesen moderat hypoxischen Bedingungen Apoptose induziert. Dadurch könnte das Heranwachsen der nicht-vaskularisierten Mikrometastasen zu klinisch relevanten Metastasen in vielen Fällen unterbunden werden, sodass C33/CD82-positive Tumore über ein geringeres Metastasierungspotential als C33/CD82-negative verfügen.

Hochregulation von C33/CD82 und damit zur Induktion von Apoptose führen, die das Heranwachsen von häufig nicht detektierten Mikrometastasen zu detektierbaren klinisch relevanten Metastasen verhindert. Im Gegensatz dazu ist in Zellen, in denen C33/CD82 nicht mehr transkriptionell aktiviert werden kann, die Gefahr der Apoptoseinduktion und damit der Metastasensuppression deutlich geringer. Diese Modellvorstellung, die in Abbildung 5.3 illustriert ist, könnte erklären, warum entweder die Expression von p53 oder die von C33/CD82 in so vielen stark-metastasierenden Tumoren und Metastasen herabreguliert ist. Vergleichbare Zusammenhänge zwischen Apoptoseinduktions- und Metastasierungspotential wurden bereits von McConkey und Glinsky et al publiziert (Glinsky et al., 1997; McConkey et al., 1996).

Möglicherweise ist die C33/CD82-Apoptose unter hypoxischen Bedingungen auch deshalb von besonderer Bedeutung, weil bei derartigen hypoxischen Bedingungen andere proapoptische Stimuli nicht mehr aktiv sind, die auf verstärkend wirkende, an der mitochondrialen Elektronentransportkette generierte reaktive Sauerstoffintermediate angewiesen sind (z.B. TNF, vgl. Abbildung 4.21 A). Grundlage dieser Hypothese sind Beobachtungen, dass die Aktivität der mitochondrialen Elektronentransportkette und damit möglicherweise auch die dort erfolgende Sauerstoffintermediat-Bildung bereits bei moderat hypoxischen Bedingungen vermindert ist (Chandel et al., 1997; Chandel und Schumacker, 2000; Lahiri, 2000). C33/CD82 ist im Gegensatz zu diesen Stimuli, wie in Abschnitt 5.2 dargelegt, nicht auf an der Atmungskette gebildete Sauerstoffintermediate angewiesen und gehört somit zu den proapoptischen Stimuli, die auch unter moderat hypoxischen Verhältnissen (1 % O₂) noch effizient Apoptose induzieren. Vielleicht ist dies auch ein Grund dafür, dass in vielen metastasierenden Zellen – alternativ zur Inaktivierung von p53 und C33/CD82 – Radikal-inaktivierende Enzyme wie Superoxid-Dismutasen verstärkt exprimiert werden (Malafa et al., 2000), wodurch die Metastasierung nachweislich verstärkt wird (Nonaka et al., 1993).

Ein weiterer wichtiger, in dieser Arbeit demonstrierter Aspekt ist, dass C33/CD82 nicht nur bei starker Expression Apoptose auslöst, sondern auch bei normalem Expressionsniveau Zellen gegenüber spezifischen proapoptischen Stimuli sensitiviert: Es gelang, die C33/CD82-Expression in CD82-defizienten Prostatakarzinomzellen durch stabile Transfektion wieder herzustellen (vgl. Abbildung 4.12 A und Abbildung 4.16 B). Diese rekonstituierten Zellen exprimieren vergleichbare C33/CD82-Mengen wie unbehandelte HeLa- oder MCF-7-Zellen und unterscheiden sich nicht bezüglich ihres Wachstumsverhaltens von der parentalen PC3-Zelllinie. Allerdings sind sie sensitiver gegenüber Cycloheximid-induzierter Apoptose als die C33/CD82-defiziente parentale Zelllinie. Dahingegen zeigen sie keinerlei

Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber anderen proapoptotischen Stimuli wie TNF α , anti-Fas-Antikörpern, Etoposid, Arsentrioxid, Actinomycin D oder Puromycin (vgl. Abschnitt 4.4.2). Dieses Verhalten unterscheidet sich damit von der aus der Literatur bekannten Fähigkeit von Cycloheximid, Zellen gegenüber proapoptotischen Stimuli wie H₂O₂, TRAIL oder auch FasL zu sensitivieren (Fujita et al., 2000; Quirk et al., 1998); denn im Gegensatz zu dem mit C33/CD82 beobachteten Synergismus werden diese Effekte auch mit anderen Inhibitoren der Proteinsynthese wie Actinomycin D oder Puromycin erzielt (Fulda et al., 2000; Van Valen et al., 2000). Möglicherweise sind für den mit C33/CD82 beobachteten Unterschied kleine Unterschiede in der Effizienz oder Art der Wirkung von Cycloheximid im Vergleich zu den anderen verwendeten Inhibitoren verantwortlich, denn diese inhibieren die Proteinbiosynthese auf verschiedene Weise: Actinomycin D inhibiert die Transkription, das Struktur analog der Aminoacyl-tRNA Puromycin die Elongation bei der Translation und das Glutarimid-Derivat Cycloheximid verhindert sowohl die Initiation als auch die Elongation bei der Translation.

Eine andere Erklärung für die spezifische Wirkung von Cycloheximid könnte sein, dass Cycloheximid im Gegensatz zu Actinomycin D und Puromycin möglicherweise weitere Effekte in der Zelle ausübt, die unabhängig von der Translationsinhibition sind: So beobachteten Binder et al. eine Herabregulation des Glucose-Transports infolge der Behandlung mit Cycloheximid, die ihrer Meinung nach unabhängig von der translationsinhibitorischen Wirkung ist und mehr als diese für die Cycloheximid/TNF-induzierte Apoptose verantwortlich sein könnte (Binder et al., 1997). Inwieweit dieser Effekt tatsächlich unabhängig von der Translationsinhibition ist und wodurch er bedingt ist, ist nicht bekannt. Untersuchungen, ob die normale Expression von C33/CD82 Zellen gegenüber weiteren proapoptotischen Stimuli sensitiviert, könnten Aufschluss darüber geben, welches die Ursache des mit Cycloheximid beobachteten Synergismus' ist und möglicherweise zur Identifikation von u.U. therapeutisch nutzbaren Substanzen oder Proteinen führen.

Der mit Cycloheximid beobachtete Synergismus, so er denn durch eine Inhibition der Translation oder durch Beeinflussung der Glucose-Aufnahme bedingt ist, könnte das Äquivalent einer auch *in vivo* eintretenden Situation sein: In Zellen, die im Verlauf der Metastasierung in eine ihnen „fremde“ Umgebung gelangen, der die für sie typische Kombination an Überlebenssignalen und Wachstumsfaktoren fehlt, wird – analog zur Behandlung mit Cycloheximid – der Zellstoffwechsel vermindert. Dies ist insbesondere im

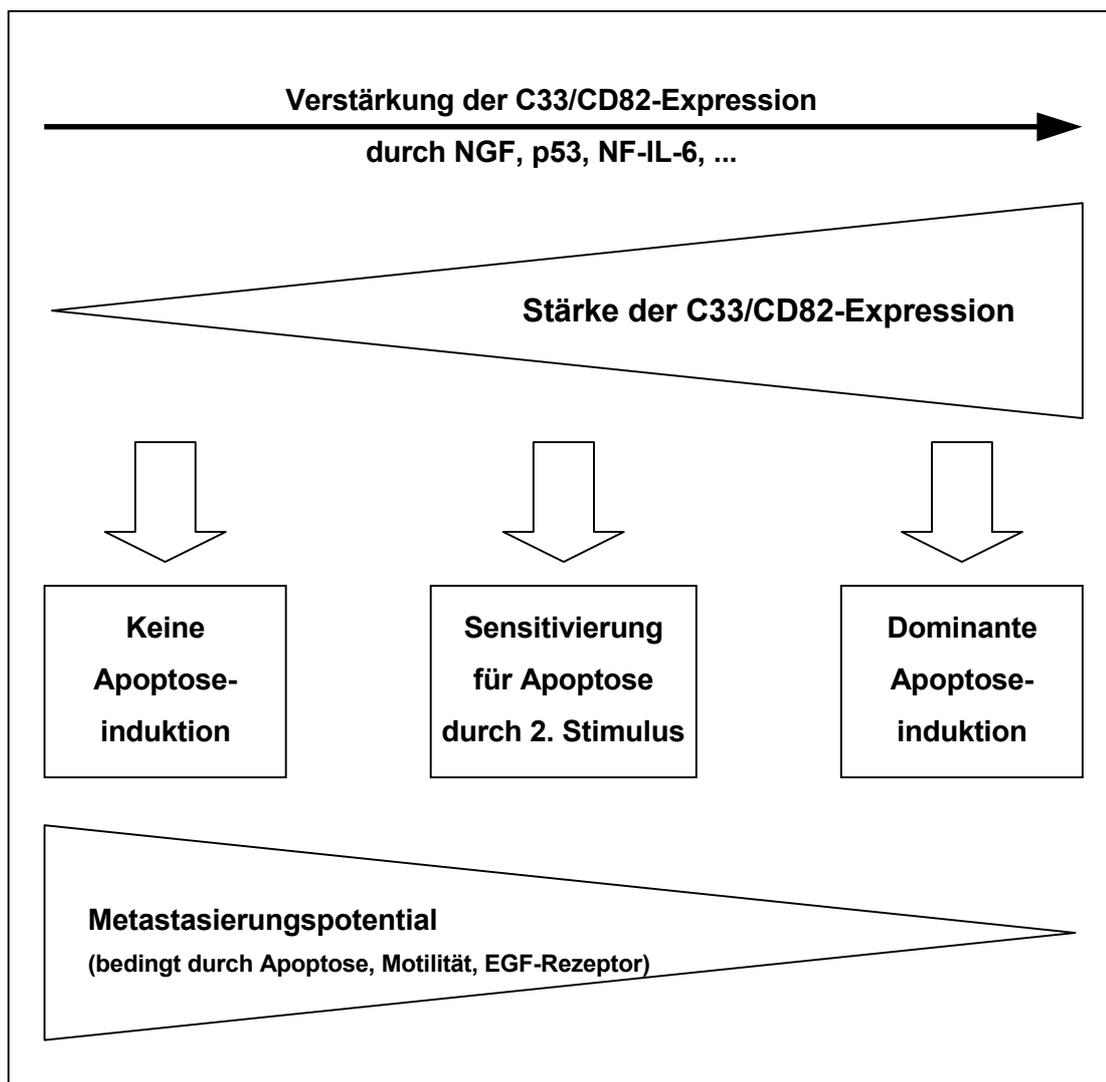


Abbildung 5.4 Modell der proapoptischen Aktivität von C33/CD82 (Modell)

Die Expression von C33/CD82 kann durch die Transkriptionsfaktoren p53 und NF-IL-6 gesteigert werden; der Nerven-Wachstumsfaktor NGF kann sogar die Re-Expression von C33/CD82 in C33/CD82-defizienten Zellen einleiten. Erreicht dadurch die Expression von C33/CD82 ein bestimmtes Niveau – etwa das, das in stabil transfizierten Zelllinien erreicht wird und dem entspricht, das Zellen exprimieren, in denen die C33/CD82-Expression nicht herabreguliert ist – sensitiviert C33/CD82 gegenüber spezifischen proapoptischen Stimuli (z.B. Cycloheximid). Bei noch stärkerer Expression, die dem Niveau der Überexpression nach transienter Transfektion entspricht, induziert C33/CD82 dominant Apoptose. C33/CD82 kann also nicht nur, wie bislang angenommen, durch Beeinflussung der Zellmotilität und der EGF-Signaltransduktion zu Metastasensuppression beitragen, sondern auch – wie in dieser Arbeit gezeigt – durch Sensitivierung für und Induktion von Apoptose.

Inneren nicht-vaskularisierter Metastasen der Fall, wo die Zellen nicht nur von diffundierenden Wachstumsfaktoren, sondern auch von Nährstoffen abgeschieden sind. Infolge

dessen könnte es in C33/CD82-positiven Zellen möglicherweise auch *in vivo* – bei normaler Expression des Proteins – zur Induktion von Apoptose kommen. Dies wäre eine weitere Erklärung dafür, warum sich die Inaktivierung von C33/CD82 für die Metastasierung als vorteilhaft erweist.

Nach den Erkenntnissen dieser Arbeit kann also die Induktion der Apoptose, wie in Abbildung 5.4 dargestellt, prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen erfolgen: einerseits ausgelöst durch ein hohes Expressionsniveau von C33/CD82, das z.B. unter hypoxischen Bedingungen durch transkriptionelle Aktivierung erzielt werden könnte, und andererseits durch einen zweiten Stimulus, der wie Cycloheximid die Apoptoseinduktion in den durch Expression normaler Mengen C33/CD82 sensitivierten Zellen auslöst.

Diese Ergebnisse sind eine weitere Rechtfertigung für die Klassifizierung von C33/CD82 als negativer prognostischer Faktor. Vielleicht können sie aber auch als Anregung dafür dienen, neue Tumorthérapien zu entwickeln, bei denen beispielsweise – wie von Sigala et al. (1999) beschrieben – durch Faktoren wie NGF die Re-Expression von C33/CD82 eingeleitet wird. Auch wenn diese Re-Expression nicht das Niveau erreicht, das dominant Apoptose induziert, könnte sie doch die Tumorzellen für Apoptose sensitivieren und zusammen mit einem zweiten endogenen oder applizierten Stimulus durch Apoptose eliminieren.

6 Zusammenfassung

Die Apoptose ist ein genetisch codiertes Suizidprogramm, das es jeder eukaryontischen Zelle erlaubt, auf bestimmte endogene oder äußere Signale mit einem kontrollierten Degradations- und Absterbeprozess zu reagieren. Auf diese Weise werden dem Organismus überzählige oder geschädigte Zellen entzogen, ein Prozess, der z.B. bei Krankheiten wie Krebs zumindest partiell ausser Kraft gesetzt ist.

Um neue Einblicke in das erst in Teilen aufgedeckte Netzwerk Apoptose-induzierender Gene zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Expressions-Screeningverfahren zur Identifikation neuer proapoptotischer Gene eingesetzt. Mit diesem Verfahren, das auf der Fähigkeit der Gene dominant Apoptose zu induzieren basiert, wurden mehr als 50 neue Apoptose-induzierende Gene isoliert, von denen einige Ursache bestimmter Krankheiten sein könnten. Aus diesen wurde das Metastasensuppressorgen C33/CD82 für weitere Untersuchungen ausgewählt, da seine Expression in zahlreichen stark metastasierenden Tumoren herabreguliert ist und es bislang nicht als proapoptotisch beschrieben wurde, obwohl es eines der bislang bestcharakterisiertesten Metastasensuppressorgene ist und die Apoptose ein kritischer Faktor bei der Metastasierung ist.

C33/CD82-Apoptose erfolgt durch Aktivierung der Mitochondrien. Dadurch kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren in das Cytoplasma, wo diese Caspasen aktivieren, sodass es zur Ausprägung charakteristischer Merkmale der Apoptose kommt: neben morphologischen Veränderungen, wie der Ausbildung apoptotischer Körperchen, wird Phosphatidylserin exponiert und die DNA und bestimmte Proteine werden degradiert. Ausgelöst wird die C33/CD82-Apoptose durch Superoxidanionen, die anders als bei Standard-Apoptosewegen nicht an der mitochondrialen Elektronentransportkette gebildet werden.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass auch einige andere Mitglieder der Tetraspanin-Superfamilie, der C33/CD82 angehört, Apoptose induzieren: hierzu zählen CD9, CD37, CD81 und CD151 und in geringerem Umfang auch CD53 und CD63. Mit Hilfe trunkierter Mutanten wurde der für die Apoptoseinduktion verantwortliche Bereich auf die ersten 119 Aminosäuren von C33/CD82 eingegrenzt.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist die C33/CD82-Apoptose eine wesentliche neue Eigenschaft des Proteins: Sie könnte neben der Beeinflussung der Zellmotilität, die durch E-Cadherin und Integrine vermittelt wird, mit denen C33/CD82 interagiert, und der

Internalisierung des EGF-Rezeptors, die durch C33/CD82 beschleunigt wird, zur Wirkung des Proteins als Metastasensuppressor beitragen.

Die Überexpression von C33/CD82 induziert nicht nur Apoptose in allen getesteten Tumorzelllinien, sondern auch unter hypoxischen Bedingungen. *In vivo* sind derartige Bedingungen im Inneren nicht vaskularisierter Tumore und Metastasen zu finden. Dort könnten sie, bedingt durch die Hypoxie-aktivierbaren Transkriptionsfaktoren p53 und NF-IL-6, zu einer Verstärkung der C33/CD82-Expression führen. Die Vermeidung von Hypoxie-induzierter C33/CD82-Apoptose könnte ein Grund dafür sein, dass die Expression von C33/CD82 in vielen untersuchten stark metastasierenden Tumoren herabreguliert ist.

Eine Besonderheit von C33/CD82 ist, dass nicht nur seine Überexpression dominant Apoptose induziert, sondern dass bereits das normale Expressionsniveau Zellen für wenigstens einen spezifischen proapoptotischen Stimulus sensitiviert. Im Fall dieser Arbeit war dies Cycloheximid, welches stellvertretend für weitere applizierbare und möglicherweise therapeutisch verwendbare Stimuli stehen könnte. Vielleicht existiert auch ein Cycloheximid entsprechender endogener Stimulus, der wie Cycloheximid ausschließlich in C33/CD82-positiven Zellen Apoptose auslöst.

Die in dieser Arbeit entdeckten Fähigkeiten von C33/CD82, dominant Apoptose zu induzieren und Zellen für Apoptoseinduktion zu sensitivieren, sind neue Eigenschaften des Metastasensuppressors C33/CD82, die zu der *in vivo* beobachteten, in der Literatur vielfach beschriebenen Metastasensuppression beitragen können.

7 Literatur

- Adachi M, Taki T, Ieki Y, Huang CL, Higashiyama M, Miyake M, 1996. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 56:1751-5.
- Adachi M, Taki T, Konishi T, Huang CI, Higashiyama M, Miyake M, 1998. Novel staging protocol for non-small-cell lung cancers according to MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 gene expression. *J Clin Oncol* 16:1397-406.
- Adams JM, Cory S, 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-6.
- Afanas'ev VN, Korol BA, Mantsygin Yu A, Nelipovich PA, Pechatnikov VA, Umansky SR, 1986. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett* 194:347-50.
- Afshari CA, Bruno ME, Lamb PW, Kenney N, Barrett JC, 1999. Interaction of the metastasis suppressing proteins KAI1 and E-cadherin in epithelial cells. *Proc Am Ass Can Res* 40:197.
- Albayrak T, 2001. Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung von Cytochrom bL und Saip, zweier Apoptose-induzierender Gene. Dissertation: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ, 2000. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* 6:100-2.
- Antonsson B, Martinou JC, 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256:50-7.
- Aravind L, Dixit VM, Koonin EV, 1999. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 24:47-53.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH, 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136:593-608.
- Ashkenazi A, Dixit VM, 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-8.

- Bauer G, Dormann S, Engelmann I, Schulz A, Saran M, 2000. Reactive oxygen species and apoptosis. In: Apoptosis and its modulation by drugs (G. CR, ed). Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 275-318.
- Bauer MKA, Schubert A, Rocks O, Grimm S, 1999. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* 147:1493-1502.
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B, 2000. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287:848-51.
- Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Mirabelli F, Finardi G, Nicotera P, Orrenius S, 1992. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca²⁺ concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res* 52:1342-6.
- Berditchevski F, Odintsova E, 1999. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 146:477-92.
- Bienstock RJ, Barrett JC, 2001. KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog* 32:139-53.
- Binder C, Binder L, Kroemker M, Schulz M, Hiddemann W, 1997. Influence of cycloheximide-mediated downregulation of glucose transport on TNF alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 236:223-30.
- Birnboim HC, Doly J, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23.
- Bishop AL, Hall A, 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-55.
- Boll W, Ohno H, Songyang Z, Rapoport I, Cantley LC, Bonifacino JS, Kirchhausen T, 1996. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *Embo J* 15:5789-95.
- Borner C, Monney L, 1999. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6:497-507.
- Boucheix C, Duc GHT, Jasmin C, Rubinstein E, 2001. Tetraspanins and malignancy. *Expert Reviews in Molecular Medicine* <http://www-ermm.cbuc.cam.ac.uk/01002381h.htm>.

- Boucheix C, Rubinstein E, 2001. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58:1189-205.
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A, 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286:1735-8.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM, 2000. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 256:27-33.
- Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, Cohen GM, 2001. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *Embo J* 20:998-1009.
- Braun MY, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J, 1996. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 183:657-61.
- Buchet K, Godinot C, 1998. Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem* 273:22983-9.
- Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, et al., 1995. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269:1885-8.
- Burchert A, Notter M, Dietrich Menssen H, Schwartz S, Knauf W, Neubauer A, Thiel E, 1999. CD82 (KAI1), a member of the tetraspan family, is expressed on early haemopoietic progenitor cells and up-regulated in distinct human leukaemias. *Br J Haematol* 107:494-504.
- Cai J, Jones DP, 1998. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273:11401-4.
- Campiglio M, Ali S, Knyazev PG, Ullrich A, 1999. Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer. *J Cell Biochem* 73:522-32.
- Cannon KS, Cresswell P, 2001. Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. *Embo J* 20:2443-53.

- Carson DA, Lois A, 1995. Cancer progression and p53. *Lancet* 346:1009-11.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B, 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-70.
- Cassarino DS, Bennett JP, Jr., 1999. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 29:1-25.
- Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Dataa P, Alnemri ES, Shi Y, 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104:769-80.
- Chandel NS, Budinger GR, Choe SH, Schumacker PT, 1997. Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *J Biol Chem* 272:18808-16.
- Chandel NS, Schumacker PT, 1999. Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Lett* 454:173-6.
- Chandel NS, Schumacker PT, 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 88:1880-9.
- Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, Bolton J, Shi L, Dubik D, Greenberg A, 1999. Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 274:7-10.
- Chien J, Shah GV, 2001. Role of stimulatory guanine nucleotide binding protein (G α) in proliferation of PC-3M prostate cancer cells. *Int J Cancer* 91:46-54.
- Chien J, Wong E, Nikes E, Noble MJ, Pantazis CG, Shah GV, 1999. Constitutive activation of stimulatory guanine nucleotide binding protein (G α)-mediated signaling increases invasiveness and tumorigenicity of PC-3M prostate cancer cells. *Oncogene* 18:3376-82.
- Chinnaiyan AM, 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1:5-15.
- Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM, 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:4961-5.

-
- Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, Bottger A, David CN, 1999. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* 9:959-62.
- Cohen JJ, Duke RC, 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132:38-42.
- Crompton M, 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341:233-49.
- Cross AR, Jones OT, 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1057:281-98.
- Czech C, Tremp G, Pradier L, 2000. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Prog Neurobiol* 60:363-84.
- Dang CV, Semenza GL, 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24:68-72.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME, 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-41.
- Davydov DR, 2001. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends Biochem Sci* 26:155-60.
- de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S, 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7:725-37.
- Decaudin D, Marzo II, Brenner C, Kroemer G, 1998. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: A prospective novel target of cancer therapy (Review). *Int J Oncol* 12:141-52.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G, 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-9.
- Delaguillaumie A, Lagaudriere-Gesbert C, Popoff MR, Conjeaud H, 2002. Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J Cell Sci* 115:433-443.
- Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR, 2001. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:723-49.

- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC, 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144:891-901.
- Dong JT, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT, 1997. Genomic organization of the human KAI1 metastasis-suppressor gene. *Genomics* 41:25-32.
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC, 1995. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 268:884-6.
- Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT, 1996. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res* 56:4387-90.
- Dorner A, Schulze K, Rauch U, Schultheiss HP, 1997. Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem* 174:261-9.
- Duriez C, Falette N, Cortes U, Moyret-Lalle C, Puisieux A, 2000. Absence of p53-dependent induction of the metastatic suppressor KAI1 gene after DNA damage. *Oncogene* 19:2461-4.
- El-Agnaf OM, Nagala S, Patel BP, Austen BM, 2001. Non-fibrillar oligomeric species of the amyloid ABri peptide, implicated in familial British dementia, are more potent at inducing apoptotic cell death than protofibrils or mature fibrils. *J Mol Biol* 310:157-68.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S, 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- Endele S, Fuhry M, Pak SJ, Zabel BU, Winterpacht A, 1999. LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* 60:218-25.
- Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ, 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273:20121-7.

- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC, 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20:929-35.
- Evan G, Littlewood T, 1998. A matter of life and cell death. *Science* 281:1317-22.
- Evan GI, Vousden KH, 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-8.
- Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C, 1995. Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev* 9:1846-56.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM, 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405:85-90.
- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL, 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276:1071-7.
- Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E, Piacentini M, 1989. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 245:150-4.
- Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jaattela M, 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153:999-1010.
- Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, Mehlen P, 2001. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3416-21.
- Frisch SM, Ruoslahti E, 1997. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9:701-6.
- Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY, 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 134:793-9.
- Fujita H, Morita I, Murota S, 2000. Hydrogen peroxide induced apoptosis of endothelial cells concomitantly with cycloheximide. *J Atheroscler Thromb* 7:209-15.
- Fulda S, Meyer E, Debatin KM, 2000. Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like

- interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res* 60:3947-56.
- Gil ML, Vita N, Lebel-Binay S, Miloux B, Chalon P, Kaghad M, Marchiol-Fournigault C, Conjeaud H, Caput D, Ferrara P, et al., 1992. A member of the tetra spans transmembrane protein superfamily is recognized by a monoclonal antibody raised against an HLA class I-deficient, lymphokine-activated killer-susceptible, B lymphocyte line. Cloning and preliminary functional studies. *J Immunol* 148:2826-33.
- Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ, 1997. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett* 115:185-93.
- Gnirke AU, 2000. Studien zur zellbiologischen Funktion des "Progressions-assoziierten Proteins" (PAP) und dessen Bedeutung für die Invasivität von Mammakarzinomzellen. Dissertation: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Golstein P, Ojcius DM, Young JD, 1991. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121:29-65.
- Gosden R, Spears N, 1997. Programmed cell death in the reproductive system. *Br Med Bull* 53:644-61.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ, 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91.
- Graham FL, van der Eb AJ, 1973. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54:536-9.
- Green DR, 1998. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94:695-8.
- Green DR, 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102:1-4.
- Green DR, Reed JC, 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-12.
- Grimm S, Leder P, 1997. An apoptosis-inducing isoform of neu differentiation factor (NDF) identified using a novel screen for dominant, apoptosis-inducing genes. *J. Exp. Med.* 185:1137-42.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ, 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17:3878-85.

- Guo HB, Liu F, Zhao JH, Chen HL, 2000. Down-regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by tumorigenesis- or metastasis-suppressor gene and its relation to metastatic potential of human hepatocarcinoma cells. *J Cell Biochem* 79:370-85.
- Guo X, Friess H, Graber HU, Kashiwagi M, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW, 1996. KAI1 expression is up-regulated in early pancreatic cancer and decreased in the presence of metastases. *Cancer Res* 56:4876-80.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN, 1994. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 180:525-35.
- Hammond C, Denzin LK, Pan M, Griffith JM, Geuze HJ, Cresswell P, 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol* 161:3282-91.
- Hanahan D, 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80.
- Hanahan D, Weinberg RA, 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K, 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119:203-10.
- Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ, 1999. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3:413-22.
- Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini MG, Thomas GM, Buee-Scherrer V, Cohen P, Goedert M, 1999. Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem* 274:12626-31.
- Henson PM, Bratton DL, Fadok VA, 2001. Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11:R795-805.
- Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, Takami K, Adachi M, Taki T, Ishiguro S, Nakamori S, Yoshie O, Miyake M, 1998. KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung carcinoma is a novel, favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis. *Cancer* 83:466-74.

- Hinoda Y, Adachi Y, Takaoka A, Mitsuuchi H, Satoh Y, Itoh F, Kondoh Y, Imai K, 1998. Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett* 129:229-34.
- Ho YS, Crapo JD, 1987. cDNA and deduced amino acid sequence of rat copper-zinc-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res* 15:6746.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV, 1996a. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4:387-96.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV, 1996b. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
- Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M, 1998. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol* 153:973-83.
- Husmann K, Sers C, Fietze E, Mincheva A, Lichter P, Schafer R, 1998. Transcriptional and translational downregulation of H-REV107, a class II tumour suppressor gene located on human chromosome 11q11-12. *Oncogene* 17:1305-12.
- Imai T, Fukudome K, Takagi S, Nagira M, Furuse M, Fukuhara N, Nishimura M, Hinuma Y, Yoshie O, 1992. C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J Immunol* 149:2879-86.
- Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O, 1995. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol* 155:1229-39.
- Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A, 1997. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 390:180-4.
- Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G, 1998. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *Embo J* 17:2526-33.
- Inohara N, Nunez G, 2000. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ* 7:509-10.

- Jackson P, Millar D, Kingsley E, Yardley G, Ow K, Clark S, Russell PJ, 2000. Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett* 157:169-76.
- Jackson P, Puisieux A, 2000. Is the KAI1 metastasis suppressor gene a cellular target of p53? A review of current evidence. *Biochem Biophys Res Commun* 278:499-502.
- Jia L, Allen PD, Macey MG, Grahn MF, Newland AC, Kelsey SM, 1997. Mitochondrial electron transport chain activity, but not ATP synthesis, is required for drug-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible novel mechanism of regulating drug resistance. *Br J Haematol* 98:686-98.
- Jiang S, Cai J, Wallace DC, Jones DP, 1999. Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J Biol Chem* 274:29905-11.
- Johnston IG, Rush SJ, Gurd JW, Brown IR, 1992. Molecular cloning of a novel mRNA using an antibody directed against synaptic glycoproteins. *J Neurosci Res* 32:159-66.
- Jost M, Class R, Kari C, Jensen PJ, Rodeck U, 1999. A central role of Bcl-X(L) in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands. *J Invest Dermatol* 112:443-9.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM, 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410:549-54.
- Juriscova A, Lopes S, Meriano J, Oppedisano L, Casper RF, Varmuza S, 1999. DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1c γ gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 5:323-30.
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H, 1994a. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369:31-7.
- Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P, 1994b. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265:528-30.

- Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, Yamasaki S, Lanza F, Kanematsu T, Hirohashi S, 2001. Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 35:637-42.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG, 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53:3976-85.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV, 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-26.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-57.
- Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT, 2001a. Promoter methylation of DAP-kinase: association with advanced stage in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 20:1765-70.
- Kim HL, Griend DJ, Yang X, Benson DA, Dubauskas Z, Yoshida BA, Chekmareva MA, Ichikawa Y, Sokoloff MH, Zhan P, Karrison T, Lin A, Stadler WM, Ichikawa T, Rubin MA, Rinker-Schaeffer CW, 2001b. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 metastasis suppressor gene expression is inversely related to histological pattern in advancing human prostatic cancers. *Cancer Res* 61:2833-7.
- King MP, Attardi G, 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246:500-3.
- Kirby KS, 1957. A new method for the isolation of deoxyribonucleotide acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acids and protein. *Biochem. J.* 66:495-504.
- Knaus UG, Wang Y, Reilly AM, Warnock D, Jackson JH, 1998. Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem* 273:21512-8.
- Koster F, Schinke B, Niemann S, Hermans-Borgmeyer I, 1998. Identification of shyc, a novel gene expressed in the murine developing and adult nervous system. *Neurosci Lett* 252:69-71.
- Krammer PH, 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-95.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M, 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60:619-42.

-
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B, 1995. The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 9:1277-87.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA, 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18:44-51.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lahiri S, 2000. Historical perspectives of cellular oxygen sensing and responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88:1467-73.
- Lane DP, 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-6.
- Lebel-Binay S, Lagaudriere C, Fradelizi D, Conjeaud H, 1995. CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U937 monocytic cell line. *J Leukoc Biol* 57:956-63.
- Lee JH, Welch DR, 1997. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 57:2384-7.
- Levine AJ, 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-31.
- Levy-Strumpf N, Kimchi A, 1998. Death associated proteins (DAPs): from gene identification to the analysis of their apoptotic and tumor suppressive functions. *Oncogene* 17:3331-40.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J, 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li J, Peet GW, Balzarano D, Li X, Massa P, Barton RW, Marcu KB, 2001a. Novel NEMO/IkappaB kinase and NF-kappa B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J Biol Chem* 276:18579-90.
- Li LC, Zhao H, Nakajima K, Oh BR, Filho LA, Carroll P, Dahiya R, 2001b. Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. *J Urol* 166:705-9.
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R, 1999. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *Embo J* 18:6027-36.

- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X, 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-57.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X, 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-84.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
- Loeffler M, Kroemer G, 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256:19-26.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X, 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-90.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S, 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *Faseb J* 11:428-42.
- Malafa M, Margenthaler J, Webb B, Neitzel L, Christophersen M, 2000. MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. *J Surg Res* 88:130-4.
- Mannion BA, Berditchevski F, Kraeft SK, Chen LB, Hemler ME, 1996. Transmembrane-4 superfamily proteins CD81 (TAPA-1), CD82, CD63, and CD53 specifically associated with integrin alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29). *J Immunol* 157:2039-47.
- Martin SJ, Green DR, Cotter TG, 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 19:26-30.
- Martinou JC, Green DR, 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:63-7.
- Mashimo T, Bandyopadhyay S, Goodarzi G, Watabe M, Pai SK, Gross SC, Watabe K, 2000. Activation of the tumor metastasis suppressor gene, KAI1, by etoposide is mediated by p53 and c-Jun genes. *Biochem Biophys Res Commun* 274:370-6.
- Mashimo T, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeyer PJ, Rinker-Shaeffer CW, Watabe K, 1998. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11307-11.
- Matter ML, Ruoslahti E, 2001. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* 276:27757-63.

- McConkey DJ, Greene G, Pettaway CA, 1996. Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res* 56:5594-9.
- McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S, 1989. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *Faseb J* 3:1843-9.
- McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Lowe SW, 1997. bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2345-9.
- McLaughlin R, Kelly CJ, Kay E, Bouchier-Hayes D, 2001. The role of apoptotic cell death in cardiovascular disease. *Ir J Med Sci* 170:132-40.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME, 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16:2794-804.
- Meier P, Finch A, Evan G, 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407:796-801.
- Milligan CE, Schwartz LM, 1997. Programmed cell death during animal development. *Br Med Bull* 53:570-90.
- Miyashita T, Reed JC, 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-9.
- Miyazaki T, Kato H, Shitara Y, Yoshikawa M, Tajima K, Masuda N, Shouji H, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H, 2000. Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 89:955-62.
- Morimoto H, Bonavida B, 1992. Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149:2089-94.
- Moustafa AS, Nicolson GL, 1997. Breast cancer metastasis-associated genes: prognostic significance and therapeutic implications. *Oncol Res* 9:505-25.
- Muller S, Matunis MJ, Dejean A, 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17:61-70.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM, 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926-30.

- Nagira M, Imai T, Ishikawa I, Uwabe KI, Yoshie O, 1994. Mouse homologue of C33 antigen (CD82), a member of the transmembrane 4 superfamily: complementary DNA, genomic structure, and expression. *Cell Immunol* 157:144-57.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J, 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.
- Namnoum AB, Merriam GR, Moses AM, Levine MA, 1998. Reproductive dysfunction in women with Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 83:824-9.
- Neudecker F, Grimm S, 2000. High-throughput method for isolating plasmid DNA with reduced lipopolysaccharide content. *Biotechniques* 28:107-9.
- Newbell BJ, Anderson JT, Jarrett HW, 1997. Ca²⁺-calmodulin binding to mouse alpha1 syntrophin: syntrophin is also a Ca²⁺-binding protein. *Biochemistry* 36:1295-305.
- Nicholson DW, Thornberry NA, 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306.
- Niemann S, Muller U, 2000. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet* 26:268-70.
- Nonaka Y, Iwagaki H, Kimura T, Fuchimoto S, Orita K, 1993. Effect of reactive oxygen intermediates on the in vitro invasive capacity of tumor cells and liver metastasis in mice. *Int J Cancer* 54:983-6.
- Noti JD, 2000. Adherence to osteopontin via alphavbeta3 suppresses phorbol ester-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells that overexpress protein kinase C-alpha. *Int J Oncol* 17:1237-43.
- Oak SA, Russo K, Petrucci TC, Jarrett HW, 2001. Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochemistry* 40:11270-8.
- Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F, 2000. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol* 10:1009-12.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M, 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-7.

- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H, 1996. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12553-8.
- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H, 1998. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem* 70:299-307.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ, 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-19.
- Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori S, 1999. Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation. *Cancer Res* 59:2335-9.
- Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori S, 2000. Glycosylation effect on membrane domain (GEM) involved in cell adhesion and motility: a preliminary note on functional alpha3, alpha5-CD82 glycosylation complex in Id1D 14 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279:744-50.
- Otsuki Y, Tanaka M, Yoshii S, Kawazoe N, Nakaya K, Sugimura H, 2001. Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4385-90.
- Pearson SJ, Reynolds GP, 1992. Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 144:199-201.
- Petit PX, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B, Kroemer G, Castedo M, 1997. Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem* 174:185-8.
- Pique C, Lagaudriere-Gesbert C, Delamarre L, Rosenberg AR, Conjeaud H, Dokhelar MC, 2000. Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology* 276:455-65.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B, 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389:300-5.
- Price J, Turner D, Cepko C, 1987. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:156-60.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A, 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287-96.

- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A, 2001. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293:1829-32.
- Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel RA, 1986. Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res* 14:5321-35.
- Quirk SM, Porter DA, Huber SC, Cowan RG, 1998. Potentiation of Fas-mediated apoptosis of murine granulosa cells by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and cycloheximide. *Endocrinology* 139:4860-9.
- Raff MC, 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD, 1993. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700.
- Rauch A, Schellmoser S, Kraus C, Dorr HG, Trautmann U, Altherr MR, Pfeiffer RA, Reis A, 2001. First known microdeletion within the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 99:338-42.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW, 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3:619-25.
- Rudel T, Bokoch GM, 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-4.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S, 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-9.
- Sakai T, Zhang Q, Fassler R, Mosher DF, 1998. Modulation of beta1A integrin functions by tyrosine residues in the beta1 cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 141:527-38.
- Sambrook J, Fritsch RF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Sardar AM, Bell JE, Reynolds GP, 1995. Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of HIV-1-positive patients. *J Neurochem* 64:932-5.

-
- Schleif R, Wensink PC, 1981. Practical methods in molecular biology. New York: Springer Verlag.
- Schrier SL, 1997. Pathobiology of thalassemic erythrocytes. *Curr Opin Hematol* 4:75-8.
- Schultheiss HP, Schulze K, Dorner A, 1996. Significance of the adenine nucleotide translocator in the pathogenesis of viral heart disease. *Mol Cell Biochem* 163-164:319-27.
- Scott MD, van den Berg JJ, Repka T, Rouyer-Fessard P, Hebbel RP, Beuzard Y, Lubin BH, 1993. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest* 91:1706-12.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ, 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7834-8.
- Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, Welch DR, 2000. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res* 60:2764-9.
- Sers C, Emmenegger U, Husmann K, Bucher K, Andres AC, Schafer R, 1997. Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors. *J Cell Biol* 136:935-44.
- Shibagaki N, Hanada K, Yamaguchi S, Yamashita H, Shimada S, Hamada H, 1998. Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: roles in cell adhesion and signal transduction. *Eur J Immunol* 28:1125-33.
- Shibagaki N, Hanada K, Yamashita H, Shimada S, Hamada H, 1999. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1 / ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur J Immunol* 29:4081-91.
- Shinohara T, Miki T, Nishimura N, Nokihara H, Hamada H, Mukaida N, Sone S, 2001a. Nuclear factor-kappaB-dependent expression of metastasis suppressor KAI1/CD82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53. *Cancer Res* 61:673-8.
- Shinohara T, Nishimura N, Hanibuchi M, Nokihara H, Miki T, Hamada H, Sone S, 2001b. Transduction of KAI1/CD82 cDNA promotes hematogenous spread of human lung-cancer cells in natural killer cell-depleted SCID mice. *Int J Cancer* 94:16-23.

- Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K, 2001. Loss of expression of the metastasis suppressor gene *kiss1* during melanoma progression and its association with loh of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer Res* 61:7422-5.
- Sidoti-de Fraisse C, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B, Vayssiere JL, 1998. TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* 17:1639-51.
- Sigala S, Faraoni I, Botticini D, Paez-Pereda M, Missale C, Bonmassar E, Spano P, 1999. Suppression of telomerase, reexpression of *KAI1*, and abrogation of tumorigenicity by nerve growth factor in prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 5:1211-8.
- Sionov RV, Haupt Y, 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18:6145-57.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ, 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144:281-92.
- Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW, 2001. Inactivation of the apoptosis effector *Apaf-1* in malignant melanoma. *Nature* 409:207-11.
- Sporn MB, 1996. The war on cancer. *Lancet* 347:1377-81.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, 1998. Autoactivation of procaspase-9 by *Apaf-1*-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1:949-57.
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES, 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410:112-6.
- Stewart ZA, Pietenpol JA, 2001. Syk: a new player in the field of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3:5-7.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM, 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217-45.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T, 1996. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by *Rac1*. *Biochem J* 318 (Pt 2):379-82.

- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G, 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192:571-80.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G, 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Tagawa K, Arihiro K, Takeshima Y, Hiyama E, Yamasaki M, Inai K, 1999. Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 90:970-6.
- Takaoka A, Hinoda Y, Sato S, Itoh F, Adachi M, Hareyama M, Imai K, 1998. Reduced invasive and metastatic potentials of KAI1-transfected melanoma cells. *Jpn J Cancer Res* 89:397-404.
- Thomas A, Giesler T, White E, 2000. p53 mediates bcl-2 phosphorylation and apoptosis via activation of the Cdc42/JNK1 pathway. *Oncogene* 19:5259-69.
- Thompson CB, 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-62.
- Thornberry NA, Lazebnik Y, 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-6.
- Turner PR, Mefford S, Christakos S, Nissenson RA, 2000. Apoptosis mediated by activation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP). *Mol Endocrinol* 14:241-54.
- Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Li ZG, Hong T, Miyake M, Imamura M, 1999. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 79:1168-73.
- Van Gassen G, Annaert W, Van Broeckhoven C, 2000. Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant? *Neurobiol Dis* 7:135-51.
- Van Valen F, Fulda S, Truckenbrod B, Eckervogt V, Sonnemann J, Hillmann A, Rodl R, Hoffmann C, Winkelmann W, Schafer L, Dockhorn-Dworniczak B, Wessel T, Boos J, Debatin KM, Jurgens H, 2000. Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int J Cancer* 88:252-9.

- Varmuza S, Jurisicova A, Okano K, Hudson J, Boekelheide K, Shipp EB, 1999. Spermogenesis is impaired in mice bearing a targeted mutation in the protein phosphatase 1c gamma gene. *Dev Biol* 205:98-110.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C, 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 243:167-90.
- Voehringer DW, Hirschberg DL, Xiao J, Lu Q, Roederer M, Lock CB, Herzenberg LA, Steinman L, 2000. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2680-5.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I, 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350-1.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al., 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78:343-52.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr., 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680-3.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC, 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284:339-43.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S, 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-7.
- Waterhouse R, Ha C, Dveksler GS, 2002. Murine CD9 Is the Receptor for Pregnancy-specific Glycoprotein 17. *J Exp Med* 195:277-82.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ, 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-30.
- Weintraub AS, Schnapp LM, Lin X, Taubman MB, 2000. Osteopontin deficiency in rat vascular smooth muscle cells is associated with an inability to adhere to collagen and increased apoptosis. *Lab Invest* 80:1603-15.
- White A, Lamb PW, Barrett JC, 1998. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene* 16:3143-9.

- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al., 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370:270-5.
- Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ, 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93:14559-63.
- Xiao H, Palhan V, Yang Y, Roeder RG, 2000. TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes. *Embo J* 19:956-63.
- Yan SF, Zou YS, Mendelsohn M, Gao Y, Naka Y, Du Yan S, Pinsky D, Stern D, 1997. Nuclear factor interleukin 6 motifs mediate tissue-specific gene transcription in hypoxia. *J Biol Chem* 272:4287-94.
- Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME, 2001. Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res* 61:5284-8.
- Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T, 1997. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 385:637-40.
- Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW, 2000. Metastasis-Suppressor Genes: a Review and Perspective on an Emerging Field. *J Natl Cancer Inst* 92:1717-1730.
- Yu S, Castle A, Chen M, Lee R, Takeda K, Weinstein LS, 2001. Increased insulin sensitivity in Galpha knockout mice. *J Biol Chem* 276:19994-8.
- Yu Y, Yang JL, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barrett J, Russell PJ, 1997. Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res* 3:1045-9.
- Zamzami N, Kroemer G, 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:67-71.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G, 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181:1661-72.
- Zelko I, Kobayashi R, Honkakoski P, Negishi M, 1998. Molecular cloning and characterization of a novel nuclear protein kinase in mice. *Arch Biochem Biophys* 352:31-6.

- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ, 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87:619-28.
- Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME, 2001. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 276:25005-13.
- Ziauddin J, Sabatini DM, 2001. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* 411:107-10.
- Zoratti M, Szabo I, 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241:139-76.

Publikationen

Schönfeld, N., Bauer, M.K.A., and Grimm, S.: The Metastasis Suppressor Gene C33 Induces Apoptosis by a Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Dependent Pathway; Manuskript eingereicht

Albayrak, T., Scherhammer, V., Schönfeld, N., Mund, T., Braziulis, E., Bauer, M.K.A., Scheffler, I., and Grimm, S.: Complex II of the Respiratory Chain is a Sensor for Drug Induced Apoptosis: Identification by a Screen for Proapoptotic Genes; Manuskript eingereicht

Mund, T., Gewies, A., Schönfeld, N., and Grimm, S.: Spike, a BH3-only Protein, Induces Apoptosis at the Endoplasmic Reticulum; Manuskript eingereicht

Patentbeteiligung

Grimm, S., Schoenfeld, N., Braziulis, E., Cramer, U., Gewies, A., Voss, F., Mund, T., Albayrak, T.: Apoptose-induzierende DNA-Sequenzen, Deutsche Anmeldung DE 10126344.9, 30.5.01, Veröffentlichung: 24.01.02; PCT-Anmeldung EP 01/08170, 13.07.01

Lebenslauf

Nicole Schönfeld

geboren am: 25. Juli 1972 in Bad Sobernheim

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

1978 - 1982 Grundschule, Bad Sobernheim (Rheinland-Pfalz)

1982 – 1991 Staatl. Gymnasium, Bad Sobernheim (Rheinland-Pfalz); Abschluss:
Abitur

1991 – 1998 Studium der Biologie an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg;
Abschluss: Diplom-Biologin

1994 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes

1995 & 1996 Praktika bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF),
Braunschweig

1996 Praktikum bei der BASF AG, Ludwigshafen

1994 – 1997 Studentische Hilfskraft an der Universität Oldenburg

1996 – 1998 Diplomarbeit in Genetik an der Universität Oldenburg mit dem Thema
„Konstruktion eines genetischen Systems zur Detektion natürlich
transformierbarer Bakterien“ bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Michael Lorenz
und Herrn Prof. Dr. Wilfried Wackernagel

1998 – 2002 Anfertigung der vorliegenden Promotion als wissenschaftliche
Angestellte am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei
München in der selbständigen Nachwuchsgruppe „Programmierter
Zelltod“ unter Leitung von Herrn Dr. Stefan Grimm