

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin

Betreuer : Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

und

den Instituten für Infektionsmedizin, Institut für Virologie der
Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar

Betreuer : Priv. Doz. Dr. Klaus Roemer

**Untersuchungen über die Resveratrol- induzierte
Kolontumorzellapoptose in Abhängigkeit des
proapoptotischen Bak- Proteins**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Thorsten Pöhland

Tierarzt aus Saarlouis

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan : Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter :

Prof. Dr. H.- J. Thiel

PD Dr. K. Roemer

Tag der Disputation : 13. Juli 2005

ZITAT

„Wir sind noch nicht weit genug vorangekommen in der Geschichte, um zu begreifen, dass jedes Mal, wenn ein Wissenschaftler eine Tür öffnet, sich noch zwei weitere Türen, die man bis dahin nicht bemerkt hat, dahinter verbergen.... Natürlich denken Menschen, die von den Errungenschaften ihrer Epoche hellauf begeistert sind, dass der Tag nahe ist, an dem wir alles wissen werden. Aber das ist unmöglich. Wir werden immer wieder neue Türen zu öffnen haben, die den Blick auf andere Türen öffnen. Das ist wirklich kafkaesk...“

Sir Peter Ustinov

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. Klaus Roemer für die Bereitstellung des klinisch und wissenschaftlich höchstinteressanten und vielversprechenden Themas, die Betreuung der praktischen und vor allem der theoretischen Arbeit, die kritische Durchsicht der vorliegenden Dissertation, sowie die fachlich aufschlussreichen und humorvollen Gespräche.

Herrn Professor Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus- Liebig- Universität Gießen zu vertreten und für die gründliche Durchsicht dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Nikolaus Müller- Lantzsch danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis seines Instituts, für die Förderung dieser Arbeit und sein Vertrauen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Claudia Fritzsche für die Vermittlung und Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitsmethoden und die stete Bereitschaft der kollegialen Unterstützung, Herrn Sascha Wagner für die generelle fachliche Hilfe und Frau Kristina Heyne für die Einweisung in die Methodik der Isolierung mitochondrialer Proteine und der Überlassung der entsprechenden Lösungen, sowie allen diesen Mitstreiterinnen und Mitstreitern für die netten persönlichen Gespräche.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Virologie dafür, dass sie das Arbeiten so angenehm und humorvoll gestaltet und mich in vielen Fragen mit Rat und Tat unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der Familien Pöhland und Lana, insbesondere meiner Frau Christina und meinem Sohn Nicholas. Erstgenannter für die schier unendliche Geduld und Rücksichtnahme während der zeit- und gedankenintensiven Arbeit, Letztgenanntem wegen seines meist fröhlichen Wesens, welches mir auch über die teilweise schweren Tage hinweg half. Die Hilfe und Unterstützung dieser Personen hat mir die Anfertigung dieser Dissertation überhaupt erst ermöglicht.

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	VI
III	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	VIII
1	EINLEITUNG	1
1.1	DER ZELLTOD	1
1.1.1	Alterung.....	1
1.1.2	Autophagie.....	2
1.1.3	Mitotische Katastrophe.....	2
1.1.4	Nekrose.....	3
1.2	APOPTOSE	3
1.2.1	Bedeutung der Apoptose	3
1.2.2	Kennzeichen der Apoptose	4
1.2.3	Wege zur Apoptose.....	5
1.2.3.1	Die extrinsische Apoptoseinduktion.....	5
1.2.3.2	Die intrinsische Apoptoseinduktion.....	7
1.2.3.2.1	Das Endoplasmatische Retikulum (ER).....	7
1.2.3.2.2	Die mitochondriale Apoptose	7
1.2.3.2.3	Caspasen.....	7
1.2.3.2.4	Die Caspasen- unabhängige mitochondriale Apoptose	9
1.2.3.2.5	Die Caspasen- abhängige mitochondriale Apoptose	9
1.2.3.3	Die Regulation des mitochondrialen Apoptosesignals.....	10
1.3	DIE BCL- 2 FAMILIE	11
1.3.1	Die „BH- 3 only“ Proteine	13
1.3.2	Die „multidomain antiapoptotic BCL- 2s“	13
1.3.3	Die „multidomain proapoptotic BCL- 2s“	14
1.3.4	Die Aktivierung von Bax und Bak.....	15
1.3.5	Das p53 Tumorsuppressorprotein.....	17
1.3.6	BCL- 2 und die Entstehung von Neoplasien	18
1.4	DIE BEDEUTUNG VON DICKDARMTUMOREN	19
1.5	KONVENTIONELLE PRÄVENTION VON KOLONUMOREN	21
1.6	RESVERATROL (RSV)	23
1.6.1	Entdeckung	23
1.6.2	Die Wirkungen von Resveratrol	24

1.6.2.1	Antiinflammatorisch	24
1.6.2.2	Cardioprotektion	25
1.6.2.3	Anticancerogen.....	25
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	29
2	MATERIAL.....	31
2.1	CHEMIKALIEN	31
2.2	PUFFER	31
2.3	ENZYME.....	32
2.4	GRÖßEN- UND MOLEKULARGEWICHTSMARKER	32
2.4.1	DNA- Größenmarker	32
2.4.2	Protein- Molekulargewichtsmarker.....	32
2.5	ANTIKÖRPER.....	33
2.5.1	Primärantikörper	33
2.5.2	Sekundärantikörper.....	33
2.6	BAKTERIENSTÄMME.....	34
2.7	NÄHRMEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i>	34
2.8	LÖSUNGEN ZUR PRÄPARATIVEN PLASMID- DNA- ISOLIERUNG	34
2.9	ZELLINIEN	35
2.9.1	HCT116.....	35
2.9.2	HCT116 Bax-/-	35
2.9.3	HCT116 p53-/-	35
2.10	MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR	36
2.11	LÖSUNGEN ZUR HERSTELLUNG VON GESAMTPROTEINEXTRAKTEN	36
2.12	LÖSUNGEN FÜR DIE SDS- POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	36
	(SDS-PAGE).....	36
2.13	LÖSUNGEN FÜR DEN WESTERN- BLOT	37
2.14	LÖSUNGEN ZUR MITOCHONDRIEN- ISOLIERUNG AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN	37
2.15	VEKTOREN UND SIRNAs	38
2.15.1	Vektoren.....	38
2.15.1.1	Der Expressionsvektor pSUPER	38
2.15.1.2	Der retrovirale Vektor pBabe- puro.....	39
2.15.1.3	Der fluoreszenzgekoppelte Vektor pEGFP-C1	39

2.16	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	40
2.16.1	Bak siRNA und Kontroll- siRNA	40
2.16.2	Sequenzen für pSUPER- Vektor	41
2.16.3	Sequenz für die Überexpression des humanen Bak- Proteins.....	41
2.17	MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	42
2.17.1	Sonstige Materialien.....	42
3	METHODEN	43
3.1	DNA- TECHNIKEN	43
3.1.1	Modifikationen von DNA.....	43
3.1.1.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	43
3.1.1.2	Dephosphorylierung von DNA- Enden.....	43
3.1.1.3	Anlagerung der 64mer- Oligonukleotide	43
3.1.1.4	Ligation von DNA- Fragmenten	44
3.1.2	Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien: Minipräparation.....	44
3.1.3	Präparative Plasmid- DNA- Isolierung.....	45
3.1.4	Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	46
3.1.5	Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	47
3.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA:	
	Agarosegelelektrophorese	48
3.2	RNA- TECHNIKEN	49
3.2.1	RNA- Isolierung.....	49
3.2.2	DNase- Verdau isolierter RNA	49
3.2.3	Herstellung von cDNA: Reverse Transkription.....	49
3.3	PROTEINTECHNIKEN	50
3.3.1	Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung.....	50
3.3.1.1	Zellaufschluss.....	50
3.3.1.2	Isolierung der High Membrane (HM) Proteinfraktion	50
3.3.1.3	Isolierung der zytosolischen Proteinfraktion	51
3.3.1.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	51
3.3.2	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese.....	51

3.3.3	Western Blot (Immunoblot)	53
3.3.3.1	Proteintransfer	53
3.3.3.2	Detektion durch Chemolumineszenz	53
3.4	ZELLKULTURTECHNIKEN	54
3.4.1	Kultivierung von HCT 116- Zellen	54
3.4.2	Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY	54
3.4.3	Transfektionseffizienz	55
3.4.4	Durchflusscytometrie (FACS- Analyse)	56
3.4.5	Stabile Transfektionen eukaryotischer Zellen	57
3.4.6	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	57
3.4.6.1	Transiente Transfektion mit EFFECTENE® (Qiagen)	58
3.4.6.2	Transiente Transfektion mit RNAiFect® (Qiagen)	58
4	ERGEBNISSE	60
4.1	SELEKTIVITÄT DES BAK ANTIKÖRPERS	60
4.1.1	Transfektionseffizienz der HCT116 Zellen für Plasmide	60
4.1.2	Transiente Transfektionen mit dem Expressionsvektor pEGFP-C1	
	mit dem Insert für das humane Bak- Protein	61
4.2	AKTIVIERUNG VON BAK DURCH RESVERATROL	63
4.3	ABHÄNGIGKEIT DER AKTIVIERUNG VON BAK VOM TUMORSUPPRESSOR P53	66
4.4	AUSWIRKUNGEN DER BAK- AKTIVIERUNG	68
4.4.1	Cytochrom c Freisetzung nach Bak- Aktivierung	68
4.4.2	Caspase- 9- Aktivierung durch Cytochrom c	70
4.4.3	Aktivierung der Effektorcaspase- 3	71
4.4.4	Freisetzung von Apoptosis Inducing Factor (AIF)	71
4.4.5	Freisetzung von HtrA2/Omi	72
4.5	AUSSCHALTEN DES BAK GENS	74
4.5.1	RNA- Interferenz	74
4.6	VERSUCH ZUR HERSTELLUNG STABILER ZELLINIEN	78
4.6.1	Einbau der Bak- Sequenz	78
4.6.2	Ligationsverdau	78
4.6.3	Transfektionseffizienzen der eingesetzten Zelllinien	79
4.6.4	Bak Gehalt der stabilen Klone im Western Blot	81

4.6.5	Anzahl der herangezogenen und untersuchten Zellklone	84
4.6.6	Gehalt an Bak- mRNA in den transfizierten Zelllinien	84
4.7	TRANSIENTE RNA- INTERFERENZ MITTELS SYNTHETISCHER siRNA	86
4.7.1	Dauer und Effizienz der Repression von Bak.....	87
4.7.1.1	Transfektionseffizienzen	87
4.7.1.2	Verlauf der Bak- Repression in HCT116	89
4.7.1.3	Verlauf der Bak Repression in HCT116 Bax-/-	90
4.8	WIRKUNG VON RESVERATROL IN ABHÄNGIGKEIT VON BAK UND BAX.....	91
4.8.1	Abhängigkeit von Bax	91
4.8.2	Die Rolle von Bak im Rahmen der Resveratrol- induzierten Apoptose	92
4.8.2.1	24- Stunden- Resveratrolbehandlung.....	97
4.8.2.2	48- Stunden- Resveratrolbehandlung.....	98
4.8.2.3	72- Stunden- Resveratrolbehandlung.....	99
4.8.2.4	Wiederholung der Versuche aus Kapitel 4.8.2.1, 4.8.2.2	
	und 4.8.2.3	100
5	DISKUSSION	103
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
7	SUMMARY.....	113
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	114

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1 :	Strukturelle Veränderungen einer Zelle während der Apoptose	5
Abb. 1.2 :	Schematische Darstellung des Fas- Rezeptorkomplexes	6
Abb. 1.3 :	Schematische Übersicht über die mitochondriale Apoptose	8
Abb. 1.4 :	Die BCL- 2 Familie	12
Abb. 1.5 :	Die Aktivierung von Bax und Bak	16
Abb. 1.6 :	Statistik der zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland 2002	21
Abb. 1.7 :	Aktivierung und Wirkung der Cyclooxygenasen	23
Abb. 1.8 :	Strukturformel von Resveratrol	24
Abb. 1.9 :	Stadien der Tumorgenese	27
Abb. 2.1 :	Der Vektor pSUPER	39
Abb. 2.2 :	Der Vektor pBabe- puro	40
Abb. 2.3 :	Der Vektor pEGFP- C1	40
Abb. 4.1:	Transfektionseffizienz der HCT116 Zellen für Plasmidtransfektionen, ausgewertet mittels FACS- Analyse	62
Abb. 4.2:	Überexpression des humanen Bak- Proteins und dessen immunologischer Nachweis	63
Abb. 4.3 :	Aktivierung von Bak durch Resveratrol	64/65
Abb. 4.4 :	Abhängigkeit der Aktivierung von Bak vom Tumorsuppressor p53	67
Abb. 4.5 :	Cytochrom c Freisetzung nach Bak- Aktivierung	69
Abb. 4.6 :	Caspase- 9 Aktivierung nach Resveratrolbehandlung	70
Abb. 4.7 :	AIF- Freisetzung nach Resveratrolbehandlung	72
Abb. 4.8 :	Freisetzung von HtrA2/Omi nach Resveratrolbehandlung	73
Abb. 4.9 :	Funktionsprinzip der RNA- Interferenz	76
Abb. 4.10 :	Funktionsprinzip des pSUPER Vektors	77
Abb. 4.11 :	Ligationsverdau pSUPER bak und pSUPER	79
Abb. 4.12 :	Transfektionseffizienz von HCT116 Bax-/-	80
Abb. 4.13 :	Transfektionseffizienz von HCT116 Zellen	80
Abb. 4.14 :	Screening der stabilen Zellklone auf den Gehalt an Bak	82

Abb. 4.15 :	Erneute Proteinanalyse der weitergezüchteten Klone.	83
Abb. 4.16 :	Anzahl der getesteten Zellklone	84
Abb. 4.17 :	Ergebnis der RT- PCR zur Untersuchung auf den Gehalt an Bak- mRNA	85
Abb. 4.18 :	Transfektionseffizienz der HCT116 Zellen für siRNA	88
Abb. 4.19 :	Transfektionseffizienz der HCT116 Bax-/- Zellen für siRNA	88
Abb. 4.20 :	Verlauf der Bak- Repression in HCT116	89
Abb. 4.21 :	Verlauf der Bak- Repression in HCT116 Bax-/-	90
Abb. 4.22 :	Abhängigkeit der Resveratrol- induzierten Apoptose von Bax	92
Abb. 4.23 :	Zellzyklusverteilung, gemessen in der FACS- Analyse (Grundprinzip)	94
Abb. 4.24 :	FACS- Daten der HCT116 cSi Zellen	95
Abb. 4.25 :	FACS- Daten der HCT116 Bax-/- cSi Zellen	95
Abb. 4.26 :	FACS- Daten der HCT116 BakSi Zellen	96
Abb. 4.27 :	FACS- Daten der HCT116 Bax-/- BakSi Zellen	96
Abb. 4.28 :	Induzierbarkeit der Apoptose durch 24stündige Behandlung mit Resveratrol	97
Abb. 4.29 :	Induzierbarkeit der Apoptose durch 48stündige Behandlung mit Resveratrol	98
Abb. 4.30 :	Induzierbarkeit der Apoptose durch 72stündige Behandlung mit Resveratrol	99
Abb. 4.31 :	Wiederholung der Versuche aus Kapitel 4.8.2.1, 4.8.2.2 und 4.8.2.3	100f.

Abkürzungen und Symbole

λ	Lambda, Wellenlänge
μ	Mikro
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Amp	Ampicillin
Apaf- 1	Apoptotic Protein Activating Factor
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
As ₂ O ₃	Arsentrioxid
ATP	Adenosintriphosphat
BCL	B- Cell Lymphoma
BH	BCL- 2 Homology Domain
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CASY	Cell Counter And Analyser System
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CytOx	Cytochrom Oxidase
d	Tag
d.h.	das heißt
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DISC	Death- Inducing Signalling Complex
DMBA	7, 12 – Dimethylbenz(a)anthracen

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	„double strand“, Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	“enhanced chemoluminescence”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndoG	Endonuklease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas- Associated Death Domain
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
griech.	griechisch
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HCT	Humane Kolontumorzellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HM	High Membrane
IAP	Inhibitor of Apoptosis- Protein
Ig	Immunglobulin
Kac	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LB	„Luria broth“

LDL	Low Density Lipoproteins
LTR	Long Terminal Repeats
m	Milli
M	Molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MMP	Microsatellite Mutator Phenotype
mRNA	“messenger”- ribonucleic acid
N-	Amino-
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non- Steroidal Antiinflammatory Drug
o.g.	oben gezeigt / oben genannt
OD	optische Dichte
p.t.	post transfectionem
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RISC	RNA- Induced Silencing Complex
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RSV	Resveratrol
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaktion
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat

sec	Sekunde
siRNA	“short interfering”- ribonucleic acid
sog.	sogenannt
SV40	„Simian virus 40”
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TE	Tris- EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenendiamin
TNBS	Trinitrobenzonsulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan
U	„Unit”, Einheit
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
w/v	Gewicht pro Volumen
WAF	„Wildtype p53 activated fragment 1“
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Der Zelltod

Der Zelltod und seine Mechanismen sind in den vergangenen ca. 150 Jahren vielfach untersucht und erklärt worden. Den ersten Terminus für das Absterben der Zellen in Metazoen prägte der Pathologe Rudolf von Virchow im Jahre 1871. Er nannte die von ihm beobachteten Veränderungen „necrosis“ oder „necrobiosis“ (Virchow, 1871). Über ein Jahrhundert hinweg umfasste dieser Ausdruck (*necrosis*, griechisch für Tod, Tötung, Absterben) alle Typen des Zelltodes. Erst 1972 befassten sich dann der australische Pathologe John F.R. Kerr und seine schottischen Kollegen Andrew H. Wyllie und Allastair R. Currie näher mit dem Auftreten und der biologischen Relevanz des Zelltodes (Kerr et al., 1972). Sie unterschieden zum ersten Mal zwischen der „Nekrose“ und der „Apoptose“ (*apo*, griech. für „ab, los, weg“ und *ptosis*, griech. für „Senkung“). Inzwischen existieren neben diesen beiden Typen des Zelltodes auch noch die Autophagie, die Alterung und die mitotische Katastrophe (Okada und Mak, 2004).

1.1.1 Alterung

In primären Zelllinien existiert eine Phase des schnellen Wachstums, in welcher es zur Kürzung der Telomeren kommt. Nach einiger Zeit verlangsamt sich dieses Wachstum und die Zelle tritt in einen permanenten Zellzyklusarrest ein. Morphologisch zeigt die Zelle eine vermehrte Granulation (Hayflick und Moorhead, 1961). Ein biochemisches Anzeichen der Alterung ist z.B. die Aktivierung der „senescence- associated β - Galactosidase“ (Dimri et al., 1995). Auf genomischer Ebene ist eine Veränderung der Genexpression und der Chromatinstruktur zu beobachten, insofern, als dass die Bildung von Heterochromatin gefördert wird (Narita, 2003). Durch die Einwirkung verschiedener Stressoren, wie z.B. tumorigener DNA- Schädigungen oder der Aktivierung von Onkogenen kann es jedoch auch zu einer vorzeitigen Alterung der Zelle kommen. Diese zeigt alle oben genannten

Merkmale, außer dem der Telomerenverkürzung (Campisi, 2001). Die Zelle tritt daraufhin in einen permanenten Zellzyklusarrest ein, welcher als ein Schutzmechanismus gegen neoplastische Entartungen angesehen werden kann. Dies verleiht der Zellalterung besondere Aufmerksamkeit bezüglich der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten von Tumorerkrankungen.

1.1.2 Autophagie

Der Proteinabbau in Zellen kann über zwei Wege erfolgen. Zum einen Ubiquitinvermittelt in den Proteasomen, zum anderen kann die Proteolyse auch in Lysosomen stattfinden. Dieser Weg kann, nach bisherigen Erkenntnissen, auch von außen induziert werden. In nährstoffarmen Situationen können Proteine und defekte Organellen in Doppelmembranstrukturen eingeschlossen werden, welche dann mit Lysosomen verschmelzen (Huang und Klionsky, 2002). Dieser Mechanismus wurde zuerst in Hefen beobachtet, viele der dort entdeckten „autophagy related genes“ gibt es aber auch beim Säuger (Reggiori, 2002). Die Autophagie kann auch unabhängig vom Zelltod auftreten.

1.1.3 Mitotische Katastrophe

Die Bezeichnung „mitotische Katastrophe“ beschrieb ursprünglich den Typ Zelltod, der dadurch zustande kommt, dass prämatüre Zellen durch eine Überproduktion der zyklinabhängigen Kinasen Cdc- 2 in Hefen bzw. CDK- 1 in Säugerzellen, also von Proteinen, die eine Kontrollpunktfunktion an den Übergängen der Teilungsphasen innehaben, zur Mitose gezwungen werden (Russell und Nurse, 1986). Inzwischen ist man jedoch dazu übergegangen jeglichen Zelltod, der durch eine Mitoseaberration hervorgerufen wird, mit diesem Terminus zu beschreiben.

Morphologisch tritt die mitotische Katastrophe durch die Bildung vielkerniger Riesenzellen mit unkondensierten Chromosomen in Erscheinung.

In nichtveränderten Zellen wird die Schwelle von der G₂- Phase in die M- Phase der Mitose nur dann überschritten, wenn eine unbeschädigte DNA vorliegt. Dieses

Überschreiten, welches zur Auflösung der Kernmembran, zur Trennung der Zentrosomen, zur Spindelausbildung und zur Chromosomenkondensation führt, wird durch die Aktivierung des CDK- 1- Cyklin- Komplex bewerkstelligt (Kimura et al., 1998; Gonczy, 2002; Karsenti und Vernos, 2001). Liegt jedoch ein Defekt des G₂ checkpoints vor, so tritt die Zelle verfrüht in die M- Phase ein. Im Falle einer beschädigten bzw. noch nicht reparierten DNA führt dies schließlich zum Tod der Zelle durch die mitotische Katastrophe.

1.1.4 Nekrose

Mit Nekrose wird der irreversible morphologische Status an Zellen beschrieben, der das Erlöschen der Zellfunktionen, wie Energiebildung und Synthesefähigkeit, kennzeichnet. Die Nekrose wird durch externe Einflüsse, wie physikalische oder chemische Traumen, Infektionen, Entzündungen, hypoxische Zustände oder Zellgifte hervorgerufen.

Morphologisches Kennzeichen der Nekrose ist ein ungeordneter Abbau des genetischen Materials, der mit einer Zerstörung des Zellkernes über die Stadien „Kernpyknose“, „Karyorrhesis“ und „Karyolyse“ einhergeht. Ein zunehmender Hydrops der Gesamtzelle und der Organellen, sowie eine vakuolisierende Degeneration führt zu einer Volumenzunahme der Zelle, die in der Ruptur der Zellmembran und somit in der Freisetzung des intrazellulären Materials mündet. Da die oben beschriebenen Noxen in der Regel viele Zellen betreffen, geht die Nekrose meist mit starken Entzündungserscheinungen einher.

1.2 Apoptose

1.2.1 Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose, der sogenannte „programmierte Zelltod“, kann in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen werden, wie z.B. Nematoden, Insekten, Fischen, Säugern und sogar Pflanzen (Aravind et al., 1999; Cikala et al., 1999; Inohara und Nunez, 2000). Diese Konserviertheit weist auf die bedeutende Rolle hin, die die

Apoptose für das Entstehen und das Überleben von vielzelligen Organismen einnimmt.

Im Rahmen der Ontogenese ist die Apoptose an der Strukturgebung mitbeteiligt, so z.B. bei der Gastrulation des Fötus (Joza et al., 2001). Auch die Entwicklung des Augenbechers und der Linse, sowie die Auflösung des Zwischengewebes und somit die Trennung der einzelnen Finger und Zehen voneinander, werden durch Apoptosemechanismen geregelt (Meier et al., 2000; Milligan und Schwartz, 1997). Es ist somit leicht erkenntlich, dass eine fehlregulierte Apoptose für den entstehenden Organismus fatale Folgen, wie z.B. Missbildungen, haben kann.

Aber auch im bereits entwickelten Lebewesen übernimmt dieser Typus des Zelltodes wichtige Aufgaben, nämlich durch den Erhalt der Gewebemöostase. Diese beinhaltet, dass überflüssige oder entartete Zellen in den „Selbstmord“ getrieben werden. Als Beispiel dient hier die Beseitigung von autoreaktiven bzw. unzureichend stimulierten T- und B- Zellen, sowie die Elimination von virusbefallenen Zellen (Bouillet et al., 1999; Braun et al., 1996; Kagi et al., 1994a ;Kagi et al., 1994b ; Krammer 2000). Auch in diesem Zusammenhang kann eine Fehlsteuerung des programmierten Zelltodes gravierende Auswirkungen haben, nämlich das Entstehen von Autoimmunkrankheiten, Immundefizienzen und von neoplastischen Tumoren (Kroemer et al., 1997).

1.2.2 Kennzeichen der Apoptose

Die morphologischen Merkmale der Apoptose stellen sich sehr charakteristisch dar (s. Abb. 1.1). Nach der Einleitung der Apoptose kondensieren Zytoplasma und Kerninhalt, was sich als verstärkte Granulation des Zellraumes bzw. durch eine unregelmäßig geformte Kernmembran darstellt. Das genetische Material wird durch Apoptose- spezifische Endonukleasen in 50-200 kb große Fragmente vor- und schließlich in ~200 bp große Fragmente gespalten, was auf dem DNA- Gel als "Laddering" erscheint. Die Kernfragmente werden, zusammen mit Anteilen des Zytoplasmas, an der Membran abgeschnürt und bilden die sogenannten "apoptotic bodies". Diese Doublelayer- Strukturen exponieren an ihrer Oberfläche Phosphatidylserinärmchen, welche als "eat me"- Signal an phagozytierende Zellen gerichtet sind. Die Externalisierung des üblicherweise an der Innenseite einer Doppelmembran befindlichen Phosphatidylserins ist charakteristisch für die Apoptose und ist energie- , d.h. ATP- Synthese- abhängig.

Eines der ersten Anzeichen eines Mitochondrien- vermittelten apoptotischen Zelltodes ist die Ödematisierung der Mitochondrien, ein Anzeichen, welches lange keine Beachtung fand, heute aber als Hinweis auf die entscheidende Rolle der Mitochondrien im Apoptosegeschehen gewertet wird (Arends und Wyllie, 1991; Kerr et al., 1994; Peitsch et al., 1994).

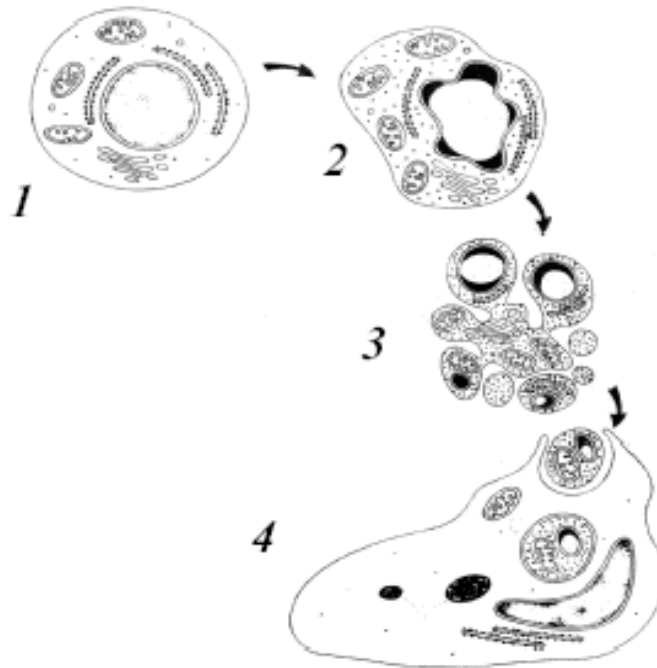


Abb. 1.1 : Strukturelle Veränderungen einer Zelle während der Apoptose. Nach dem Schrumpfen der Zelle (1) kondensieren Zytoplasma und Chromatin (2). Nun wird der Zellkern fragmentiert und es kommt zur Abschnürung von Vesikeln an der Zytoplasmamembran (3). Diese sog. "apoptotic bodies" können dann von Phagozyten beseitigt werden (4) (nach Kerr et al., 1994).

1.2.3 Wege zur Apoptose

Die Aktivierung der zum Tode führenden Mechanismen kann über zwei Wege geschehen, den extrinsischen und den intrinsischen pathway.

1.2.3.1 Die extrinsische Apoptoseinduktion

Apoptose- induzierende Signale von außen werden über Rezeptoren in der Zellmembran übermittelt. Zu diesen Rezeptoren gehören Mitglieder der TNF-

Superfamilie (z.B. Fas/CD95 und TNF α 1) und TRAIL- Rezeptoren (TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand).

Der beiden Rezeptorarten unterliegende Mechanismus soll exemplarisch am Fas-Rezeptor dargelegt werden. Nach Bindung des Fas- Liganden trimerisiert der Rezeptor, und es findet eine Konformationsänderung am zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors statt, die die Bildung eines Proteinkomplexes namens DISC (Death-Inducing Signalling Complex) hervorruft (Muzio et al., 1996). Dieser besteht aus dem zytoplasmatischen Anteil des Fas- Rezeptors, der FADD (Fas- Associated Death Domain) und der Procaspase- 8. Durch eine Spaltung Letzterer zur aktiven Caspase- 8 wird eine Enzymkaskade ausgelöst, welche die Fragmentierung des Zellkernes hervorruft (Ashkenazi und Dixit, 1999). In anderen Zelltypen kann der Rezeptor-vermittelte Zelltod aber auch die Mitochondrien aktivieren. Dies geschieht, indem von dem proapoptotischen "BH-3 only" Protein Bid (s. Kapitel 1.3.1) das kleinere tBid abgespalten wird (s. Abb. 1.2), welches dann durch Bindung an das mitochondriale anti- apoptotische BCL- 2 dieses inhibiert und so zur Apoptose beiträgt (Luo et al., 1998; Li et al., 1998).

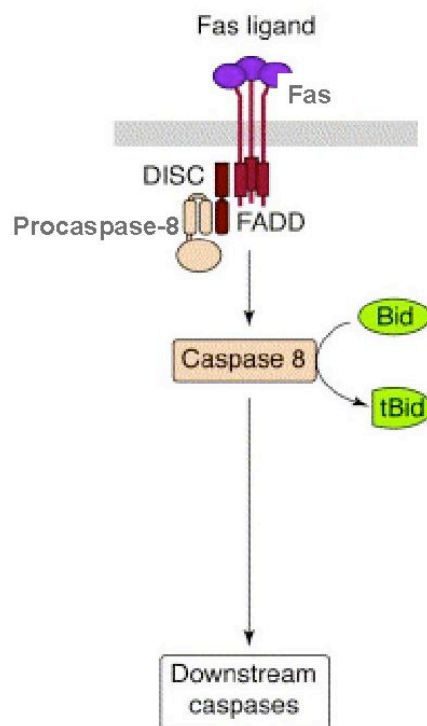


Abb. 1.2 : Schematische Darstellung des Fas- Rezeptorkomplexes. Nach Bindung des Fas-Liganden und der Trimerisierung des Rezeptors bildet sich auf zytosolischer Seite der DISC, bestehend aus Fas-Rezeptor, FADD und Procaspase- 8. Durch Spaltung der Procaspase-8 entsteht die aktive Form Caspase- 8, die, zellabhängig, sowohl Anstoß für eine Caspasen- Kaskade sein kann, als auch die mitochondriale Apoptose auslösen kann (modifiziert nach Chan und Yu, 2004).

1.2.3.2 Die intrinsische Apoptoseinduktion

1.2.3.2.1 Das Endoplasmatische Retikulum (ER)

Eine erst in den letzten Jahren stärker in den Fokus gerückte Organelle des Apoptosegeschehens ist das Endoplasmatische Retikulum (ER). Durch sein Zusammenspiel mit den Mitochondrien gilt heute auch das ER als ein wichtiger Kontrollpunkt einer korrekten Zellfunktion und somit als ein Scheideweg, an dem die Zelle entweder überlebt oder in den Tod getrieben wird. Diese Entscheidung wird anhand der Qualität der im ER modifizierten Proteine gefällt. Eine Vielzahl an Chaperonen im ER dient dem Erlangen der korrekten Tertiär- und Quartärstruktur der von der Zelle synthetisierten Proteine.

Jegliche Fehler innerhalb dieses Systems initiieren die "unfolded protein response" (UPR). Diese bedingt eine Hochregulierung der Translation von Schlüsselproteinen für die Wiederherstellung der erforderlichen Struktur (Kaufman, 1999). Ist die richtige Faltung nicht restaurierbar, wird Apoptose eingeleitet. Diese scheint durch proapoptische Mitglieder der BCL- 2 Familie, Bax und Bak an den Mitochondrien (s. Kapitel 1.3.3) vermittelt zu sein (Ferri und Kroemer, 2001).

Die bei weitem bedeutendste Organelle im Apoptosegeschehen ist jedoch das Mitochondrion selbst.

1.2.3.2.2 Die mitochondriale Apoptose

Wie bereits erwähnt, lässt sich, auf Grund der zu beobachtenden Ödematisierung, den Mitochondrien eine zentrale Rolle im Apoptosegeschehen zuordnen.

Die Abbildung 1.3 zeigt schematisch die bis heute identifizierten Vorgänge am Mitochondrion in Bezug auf die Apoptose. Resultat aller dieser Mechanismen ist der proteolytische Verdau der Zelle und die Freisetzung diverser Todeseffektoren. Diese agieren entweder Caspasen- abhängig oder Caspasen- unabhängig.

1.2.3.2.3 Caspasen

Caspasen sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate spezifisch auf der Carboxylseite eines Aspartats spalten (Alnemri et al., 1996). Sie werden als ruhende Proenzyme hergestellt und erlangen durch eine Spaltung die Fähigkeit Schlüsselsubstrate der

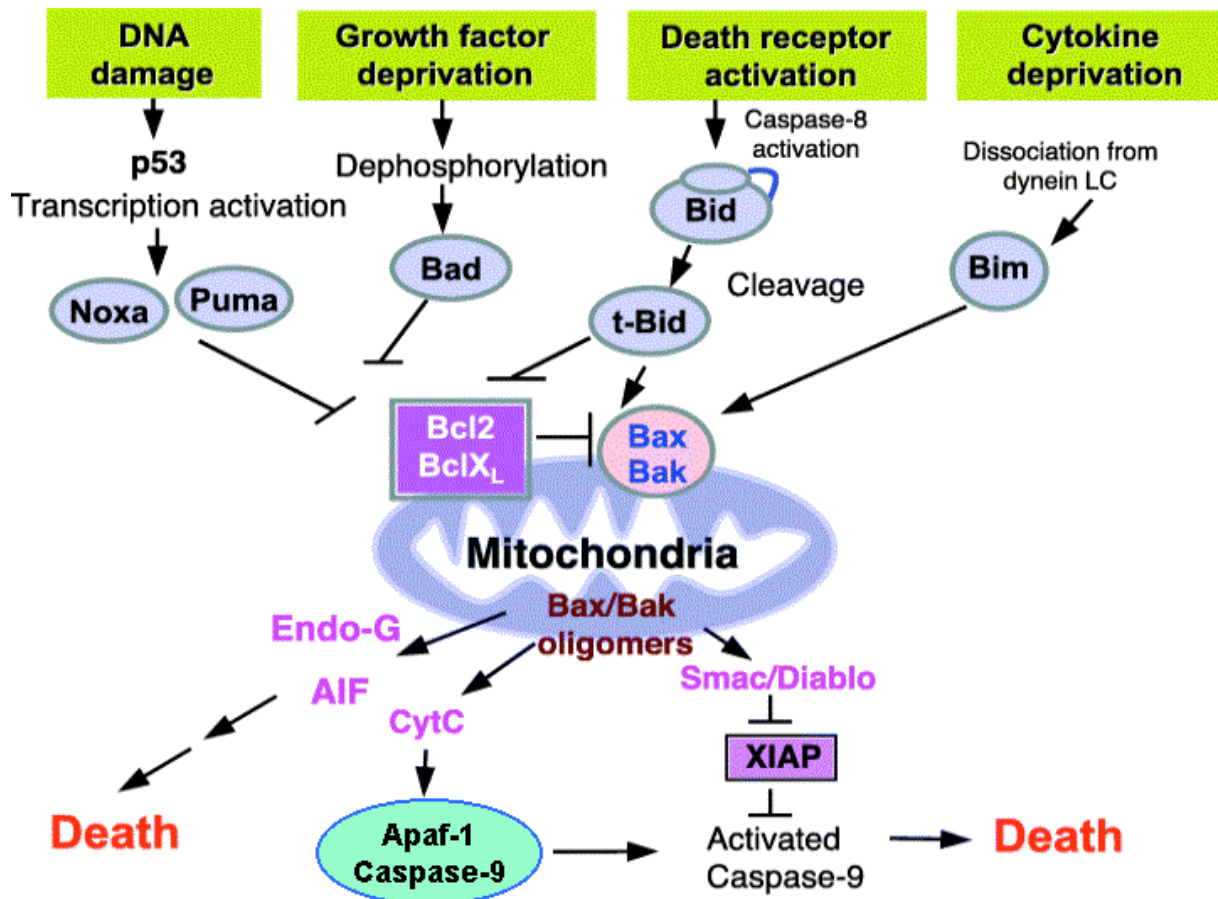


Abb. 1.3 : Schematische Übersicht über die mitochondriale Apoptose. Die Freisetzung von Todeseffektoren wird hauptsächlich durch die BCL-2 Proteine (s. Kapitel 1.3) beeinflusst. Die darauf folgende Zerstückelung der Zelle geschieht entweder in Abhängigkeit von Caspasen oder unabhängig davon. Proapoptotische Elemente sind oval, antiapoptotische eckig dargestellt (nach Chan und Yu, 2004).

Zelle abzubauen (Budihardjo et al., 1999). Die Caspasen werden in drei Unterfamilien eingeteilt, nämlich solche, die A) an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, sowie die an der Apoptose beteiligten B) Initiator- und C) Effektorcaspasen (Thornberry und Lazebnik, 1998; Earnshaw et al., 1999; Strasser et al., 2000). Die Caspasen- 2, - 8, - 9 und - 10 gehören auf Grund ihrer Stellung in der Aktivierungskaskade der Gruppe der Initiatorcaspasen an. Caspasen- 3, - 6 und - 7 sind Effektorcaspasen. Procaspase- 8 vermittelt als Bestandteil des DISC an der Zellmembran hauptsächlich extrinsische Apoptosesignale. Procaspase- 9 hingegen ist als Bestandteil des Apoptosoms (s. Kap.1.2.3.2.5) am intrinsischen pathway beteiligt.

Die Effektorcaspasen greifen an Schlüsselsubstraten der Zelle an, von denen bis heute über 100 identifiziert wurden (Kaufmann und Hengartner, 2001). Sie führen

vermutlich zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen, die während der Apoptose zu beobachten sind.

So werden die Strukturveränderungen des Kerns durch eine Zerstörung der Kernlamina, ein Vorgang, welcher auch zur Chromatinkondensierung führt, hervorgerufen (Thornberry und Lazebnik, 1998; Takahashi et al., 1996; Orth et al., 1996). Daneben werden Proteine gespalten, die an der Strukturgebung der Zelle beteiligt sind (Kothakota et al., 1997; Wen et al., 1997; Rudel und Bokoch, 1997), es findet eine Beeinflussung der biochemischen Prozesse statt, die die DNA- Reparatur und Replikation sowie das Spleißen der mRNA bestimmen (Cryns et al., 1998; Lazebnik et al., 1994; Song et al., 1996; Rheaume et al., 1997). Caspasen inaktivieren auch antiapoptotische Proteine durch Spaltung (Adams und Cory, 1998; Enari et al., 1998).

1.2.3.2.4 Die Caspasen- unabhängige mitochondriale Apoptose

In Säugerzellen gibt es neben der evolutionär konservierten Art der Caspasen-abhängigen Apoptose auch die nicht durch Caspasen vermittelte Endonukleasen-Aktivität. Letztere wird durch die Freisetzung der mitochondrialen Proteine „Apoptosis Inducing Factor“ (AIF) und „EndonucleaseG“ (EndoG) induziert. Zu diesem Zweck müssen die beiden Proteine aber zunächst von den Mitochondrien zum Zellkern transloziert werden, wo sie eine DNA- Fragmentierung bewirken (Li et al., 2001; Susin et al., 1999; Wang, 2001). Die genauen Mechanismen, wie AIF und EndoG zur Zerlegung des Kernes beitragen, ist noch nicht vollständig geklärt.

1.2.3.2.5 Die Caspasen- abhängige mitochondriale Apoptose

Der offenbar am häufigsten verwendete Weg einer geschädigten Zelle den Exitus zu bereiten, ist die Aktivierung der Caspase- Proteinkaskaden. Diese kann zum einen auf direktem Weg durch die Freisetzung von Cytochrom c und zum anderen indirekt durch das Ausschleusen der Proteine Smac/Diablo oder HtrA2/Omi aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien erfolgen.

Cytochrom c ist ein Protein, welches als Precursor synthetisiert und als Apoprotein in den Zwischenmembranraum der Mitochondrien eingeschleust wird. Dort wird es in ein globuläres Protein umgewandelt (Mayer et al., 1995). Dieses sogenannte Holo-Cytochrom c kann bei intakter äußerer Membran nun nicht mehr in das Zytosol

austreten. Wird die äußere Membran hingegen undicht, so tritt es aus und formt mit dem zytosolischen Protein „Apoptotic Protein Activating Factor- 1“ (Apaf-1) einen Komplex, der eine hohe Affinität für dATP/ATP aufweist und durch die Nukleotide die Fähigkeit zur Oligomerisierung erlangt. Es entsteht das sogenannte Apoptosom, in das auch die Procaspase- 9 rekrutiert wird (Zou et al., 1999). Wie oben erwähnt, leitet das Apoptosom das Apoptosesignal über die Aktivierung der Procaspase- 9 weiter (Stennicke et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit die Caspasen wirksam werden zu lassen, besteht darin, inhibitorische zytoplasmatische Proteine (IAPs) zu deaktivieren. Diese wurden zuerst im Baculovirusgenom entdeckt, wo sie durch ihre antiapoptotischen Eigenschaften auffielen. Danach konnten sie auch in Säugerzellen nachgewiesen werden, in denen sie mit aktivierten Caspasen - 3, - 7 und - 9 interagieren (Deveraux et al., 1997; Kaufmann und Hengartner, 2001; Shi, 2002). Die IAPs verhindern also nicht die Aktivierung der Caspasen, sondern deren Wirkung.

Die Arbeit der IAPs kann durch zwei kürzlich entdeckte proapoptotische Faktoren namens Smac/Diablo (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) und HtrA2/Omi (Suzuki et al., 2001/a) behindert werden. Diese werden, wie Cytochrom c, aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien freigesetzt und tragen somit durch eine indirekte Aktivierung der Caspasen zur Apoptose bei.

1.2.3.3 Die Regulation des mitochondrialen Apoptosesignals

Um die in den beiden vorhergehenden Kapiteln genannten Faktoren freizusetzen, ist eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran notwendig. Die Theorien zu deren Zustandekommen sind sehr vielfältig und umfassen Modelle wie die Zerstörung der Membran durch die Ödematisierung der Mitochondrienmatrix (Desagher und Martinou, 2000), die selbst wiederum durch diverse Ursachen zustande kommen soll.

Andere Ansätze postulieren eher das Vorhandensein regulierter Poren (Zörnig et al., 2001). Wie die Abbildung 1.3 impliziert, kommt den Proteinen der BCL- 2 Familie dabei größte Bedeutung zu (Wang, 2001).

1.3 Die BCL- 2 Familie

Der Namensgeber dieser Proteinfamilie, das BCL- 2 Protoonkogen, wurde erstmals in humanen follikulären B- Zell Lymphomen identifiziert (Bakhshi et al., 1985; Cleary und Sklar, 1985; Tsujimoto et al., 1985) und schien, anders als andere Onkogene, die Zelle nicht zur Proliferation anzutreiben, sondern den durch diverse Stimuli hervorrufbaren apoptotischen Zelltod zu behindern (McDonnell et al., 1989; Vaux et al., 1988). BCL- 2 wurde hauptsächlich an den Mitochondrien lokalisiert vorgefunden und unterstrich dadurch die immense Rolle dieser Organelle im Apoptosegeschehen (Hockenbery et al., 1990).

Das Wissen um die BCL- 2 Proteine konnte bis heute beträchtlich erweitert werden und eine der bedeutendsten Erkenntnisse war, dass die Mitglieder dieser Familie gänzlich entgegengesetzte Wirkung haben können.

Die Zugehörigkeit der einzelnen Proteine zu einer von drei Untergruppen wird bestimmt durch das Vorhandensein der entsprechenden BCL- 2- Homologie-Domänen (BH), von denen BH- 1, - 2, - 3 und - 4 bekannt sind (s. Abb. 1.4).

Die Proteine BCL- 2, Bcl- X_L, Mcl- 1 und Bcl- w beherbergen alle vier Homologiedomänen und werden somit den „multidomain antiapoptotic“ BCL- 2s zugeordnet. Die Vertreter der zweiten Untergruppe, die sogenannten „multidomain proapoptotic“ Proteine Bax, Bak und Bok, verfügen über die BH- Domänen - 1, - 2 und - 3.

Die Domänen BH- 1 bis - 3 formen eine hydrophobe Vertiefung, welche als Andockstelle für die BH- 3 Domäne anderer BCL- 2s dient (Sattler et al., 1997). Die BH- 4 Domäne der proapoptotischen Vertreter ist höchstwahrscheinlich beteiligt an Protein- Protein- Interaktionen mit nicht BCL- 2- Proteinen, wie z.B. der Proteinkinase Raf- 1 (Wang et al., 1994).

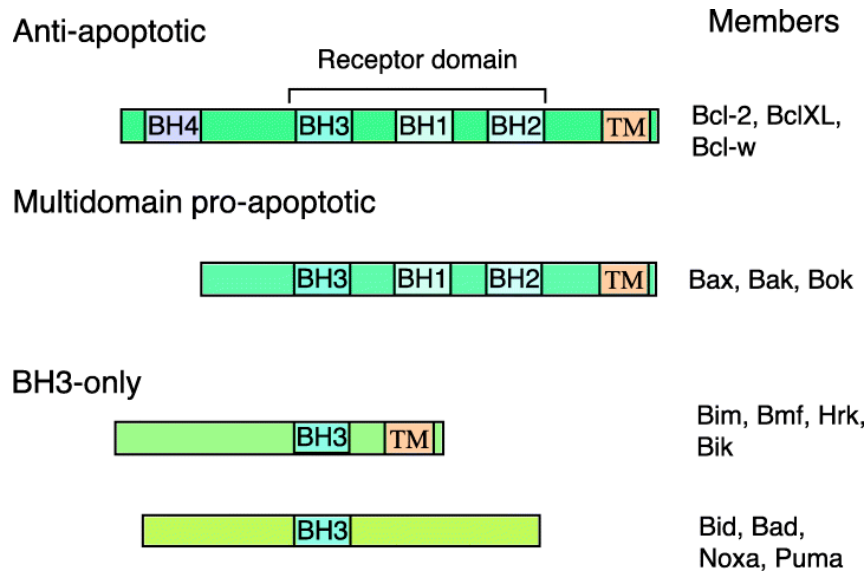


Abb. 1.4 : Die BCL- 2 Familie. Die Einteilung der Proteine erfolgt nach Wirkung und Anzahl der Homologiedomänen. Die meisten Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen zusätzlich eine Transmembrandomäne (TM), welche sie zur Verankerung in den Membranen der Mitochondrien, des ER und des Zellkerns befähigt (nach Chan und Yu, 2004).

Zentrale Bedeutung für die Wirkung der multidomain proapoptotic Faktoren scheint der BH- 3 Domäne zuzukommen (Opferman und Korsmeyer, 2003). Unterstützt wird diese Ansicht durch die Entdeckung einer dritten Untergruppe, welche ausschließlich eine Sequenz für die BH- 3 Domäne aufwies (Strasser, 2000) und der hauptsächlich eine proapoptotische Wirkung durch die Inhibition antiapoptotischer BCL- 2s zugeschrieben wird (Bouillet und Strasser, 2002).

Alle Mitglieder dieser für das Apoptosegeschehen bedeutenden Familie der BCL- 2-Proteine zeigen eine ausgeprägte Fähigkeit mit den Vertretern der eigenen Untergruppe, den der anderen Untergruppen, sowie Nicht- BCL- 2- Proteinen, zu oligomerisieren. Es können sowohl Homo- als auch Heteromultimere gebildet werden (Gross et al., 1998; Oltvai et al., 1993; Sedlak et al., 1995).

In vielen der BCL- 2s findet sich auch eine Transmembrandomäne, welche die Proteine zur Einlagerung in die Mitochondrienmembranen, die Membran des ER und des Zellkerns befähigt (Bouillet und Strasser, 2002).

Aus Analysen der Kristallstrukturen verschiedener BCL- 2 Proteine konnte eine Ähnlichkeit dieser mit den bakteriellen Toxinen Colicin und Diphtherietoxin festgestellt werden. Ebenso wie diese sind BCL- 2, Bcl- X_L und Bax in der Lage, sich als Multimere in Lipiddoppelschichten einzulagern und so Kanäle zu formen, welche sowohl für Ionen als auch für kleinere Moleküle durchlässig zu sein scheinen (Schendel et al., 1998). Dies gelingt aber unter physiologischen Bedingungen

vermutlich nur den proapoptotischen Proteinen (Antonsson, 2001), was die oben genannte Theorie der Todeseffektoren- Emission durch die von Bax und Bak gebildeten Kanäle unterstützt.

1.3.1 Die „BH- 3 only“ Proteine

So vielfältig die Anzahl der Mitglieder dieser Untergruppe ist, so zahlreich sind auch die Möglichkeiten ihrer Aktivierung und ihre Wirkweisen. In gesunden Zellen werden diese Proteine durch die Regulierung ihrer Transkription und ihrer posttranslationalen Modifikationen in Schach gehalten, um keine unkontrollierte Apoptose auszulösen, was sich nach diversen apoptotischen Stimuli ins Gegenteil wendet.

So wird die Translation der mitochondrialen BH- 3 only Proteine PUMA und Noxa durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, die wiederum durch Schäden an der DNA hervorgerufen werden kann, induziert (Nakano und Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Yu et al., 2001). Desweiteren kann eine Dephosphorylierung von Bad, z.B. nach Entzug von Wachstumsfaktoren, zur Inhibition der antiapoptotischen Wirkung von Bcl- X_L führen. (Korsmeyer, 1996). Andere BH- 3 only- Proteine (Bim, BimEL, BimL, BimS), die in inaktivem Zustand gebunden an das Zytoskelett vorliegen, lösen sich nach Aktivierung von diesem und binden an BCL- 2 und Bcl- X_L, deren Wirkung dadurch neutralisiert wird (Bouillet et al., 1999). Im Falle des bereits in Kapitel 1.2.3.1 und Abb. 1.2 gezeigten BH- 3 only Protein Bid kommt es nach Caspase- 8 Einwirkung zur Spaltung in das Protein tBid, welches vermutlich nicht nur die multidomain antiapoptotic BCL- 2s behindert, sondern auch zu einer allosterischen Aktivierung von Bax und Bak beiträgt (Wei et al., 2000).

1.3.2 Die „multidomain antiapoptotic BCL- 2s“

Die Frage, durch welche Mechanismen diese Proteine ihre Apoptose- hemmende Wirkung entfalten, ist immer noch Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Eine der bestehenden Theorien besagt, dass es durch die Ausbildung von Heterodimeren aus anti- und proapoptotischen BCL- 2s zu einer Sequestrierung der Letztgenannten

kommt und diese in ihrer Wirkung eingedämmt werden können (Leu et al., 2004; Cheng et al., 2001). Über dies hinaus können einzelne BCL- 2s selektiv reguliert werden, und zwar durch eine Protein- Protein- Interaktion zwischen BCL- 2 Mitgliedern und Nicht- BCL- 2- Proteinen, wie z.B. zwischen Bak und dem „Voltage Dependent Anion Channel 2“ (VDAC2) (Cheng et al., 2003).

In Versuchen mit mutierten Formen von BCL- 2s, welche nicht mehr in der Lage waren mit anderen Proteinen zu interagieren, konnte gezeigt werden, dass diese trotzdem ihre antiapoptotische Wirkung entfalten konnten. Damit war der Beweis erbracht, dass die Sequestrierung nicht der einzige Weg der BCL- 2s sein konnte, die Apoptose zu regulieren (Cheng et al., 1996).

Inzwischen postuliert man auch Modelle, nach welchen antiapoptotische BCL- 2s die Bildung von Sauerstoffradikalen (Hockenbery und Korsmeyer, 1993; Kane et al., 1993), sowie die intrazelluläre Azidifizierung verhindert (Gottlieb et al., 1996). Auch eine Stabilisierung des Mitochondrienmembranpotentials (Vander Heiden et al., 1997; Zamzami et al., 1995) und eine Beeinflussung des mitochondrialen Protonenflusses (Shimizu et al., 1998) wird ihnen zugeschrieben.

1.3.3 Die „multidomain proapoptotic BCL- 2s“

Neben den oben erwähnten BH- 3 only- Proteinen zählen auch die „multidomain proapoptotic“ BCL- 2s zu den Apoptoseauslösern dieser Familie. Sie enthalten jedoch die Sequenzen für die Homologiedomänen BH- 1, - 2 und - 3.

Die beiden Hauptvertreter Bax und Bak liegen weit verbreitet in vielen Zelllinien vor, wohingegen Bok fast ausschließlich im Gewebe des Fortpflanzungstraktes gefunden wird (Cory und Adams, 2002).

Bax ist ein ca. 21 kDa großes, aus 192 Aminosäureresten bestehendes Protein, welches im inaktiven Zustand als Monomer im Zytosol vorliegt bzw. in wenigen Zelllinien lose an die äußere Mitochondrienmembran gebunden vorliegt (Suzuki, 2000).

Bak, ein ca. 24 kDa großes, aus 211 Aminosäureresten bestehendes Protein, liegt hingegen auch im inaktiven Zustand gebunden an die Membran von Mitochondrien bzw. vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor (Wei et al., 2001; Scorrano et al.,

2003). Dort wird es durch Bildung von Heterodimeren mit Proteinen der eigenen Familie, aber auch anderer Proteine, in seiner proapoptotischen Wirkung behindert (Griffiths et al., 2001).

Als Hauptwirkort beider Proteine gilt das Mitochondrion (Martinou und Green, 2001), jedoch rückt auch das ER als Interaktionspartner des Mitochondrions mehr und mehr in den Fokus der Forschung (Häcki et al., 2000; Lee et al., 1999).

1.3.4 Die Aktivierung von Bax und Bak

Die Induktion der mitochondrialen Apoptose mittels diverser Stimuli (Griffiths et al., 1999; Martinou et al., 1999; Murphy et al., 2000; Gilmore et al., 2000) führt im Falle von Bak zu einer Konformationsänderung am N- Terminus, sowie an der BH- 1 Domäne (Griffiths et al., 2001). Dadurch erlangt das Protein die Fähigkeit, sowohl Homooligomere zu bilden als auch seine sequestrierende Bindung an Bcl- X_L bzw. VDAC2 auflösen zu können.

Bezogen auf Bax führt die Aktivierung zu einer Konformationsänderung sowohl am N- als auch am C- terminalen Ende. Erstgenanntes befähigt Bax, wie Bak, zur Homooligomerisierung. Die Veränderung am C- Terminus hat sowohl zur Folge, dass sich das Protein in Membranen einlagern kann, zu denen es allerdings zunächst transloziert werden muss, als auch, dass die BH- 3 Domäne, welche normalerweise durch den C- Terminus verdeckt wird, freigelegt wird (Schema s. Abb. 1.5).

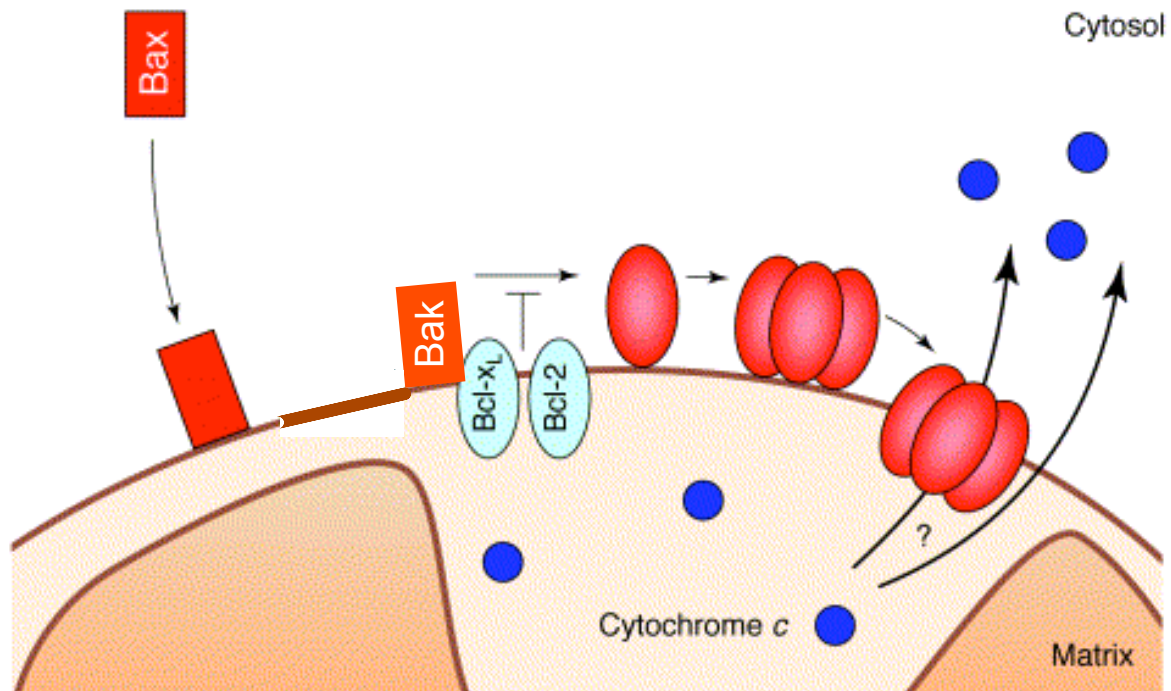


Abb. 1.5 : Die Aktivierung von Bax und Bak. Die Aktivierung der Proteine resultiert in ihrer Oligomerisierung an der äußeren Mitochondrienmembran. Die so geformte Pore dient der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranspalt in das Zytosol (modifiziert nach Desagher und Martinou, 2000).

Mit Hilfe dieser freiliegenden BH-3 Domäne können nun Protein-Protein-Interaktionen mit anderen BCL-2 Proteinen eingegangen werden (Griffiths et al., 2001).

Das Verhältnis von Homodimeren zu Heterodimeren innerhalb der BCL-2-Familie wird als einer der bestimmenden Faktoren für das Schicksal der Zelle angesehen (Oltvai und Korsmeyer, 1994). Dieses sog. „rheostat model“ ist jedoch nicht als universell bzw. einzig gültiger Mechanismus für das Apoptosegeschehen anzusehen (Knudson und Korsmeyer, 1997).

1.3.5 Das p53 Tumorsuppressorprotein

Die Erstbeschreibung des Proteins erfolgte 1979 (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Man ordnet ihm eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Aufrechterhaltung der Zellfunktion und des Zellzyklus zu.

Im nativen Zustand liegt das Protein als Homotetramer vor. Jedes Monomer hat das namengebende Molekulargewicht 53 kDa.

Das humane p53- Protein besteht aus 393 Aminosäureresten und wird unterteilt in die Transaktivierungs-, die sequenzspezifische DNA- Bindungs- und die Tetramerisierungsdomäne, sowie in fünf evolutionär hochkonservierte Domänen.

50% aller Tumoren weisen entweder kein p53 Protein auf, oder es liegt in mutierter Form vor, welches eine onkogene Wirkung zeigen kann, was man als „gain of function“ bezeichnet (Roemer, 1999). In den restlichen 50%, in denen Wildtyp- p53 erhalten ist, werden aber häufig, wenn nicht sogar immer, Mutationen der Signalwege gefunden, die zum indirekten Ausfall des Proteins führen (Hollstein, 1991; Levine, 1991). Es existiert somit wahrscheinlich überhaupt kein Tumor, in dem der p53- Pfad vollständig intakt ist.

In p53- negativen Mäusen sowie in Patienten mit Li- Fraumeni- Syndrom (p53 Allel- Inaktivierung in Zellen der Keimbahn) wurde das Auftreten spontaner Tumoren beobachtet (Donehower, 1992; Malkin, 1993).

Die Aufgaben des Proteins liegen darin, im Falle einer DNA- Schädigung einen reversiblen Zellzyklusarrest bis zur Reparatur des Genoms herbeizuführen, oder im Falle der Irreparabilität die Zelle in die Apoptose zu führen. Diese kann zum einen transkriptionsabhängig eingeleitet werden. Die entsprechenden Zielgene sind z.B. die Gene für die proapoptotischen BCL- 2 Proteine Bax, Noxa und PUMA, deren Transkription durch den Einfluss von p53 gesteigert wird. Antiapoptotische Gene, wie das für BCL- 2, können hingegen von p53 reprimiert werden (Fracchiolla et al., 1999).

Zum anderen kann eine Einflussnahme auf den programmierten Zelltod auch transkriptionsunabhängig erfolgen. So kann p53 an Mitochondrien transloziert werden, wo es in einer direkten Interaktion mit den antiapoptotischen BCL- 2 Proteinen Bcl- X_L und BCL- 2 zum Block von deren Funktionen führt (Marchenko, 2000; Moll, 2001; Mihara, 2003) oder durch Bindung an das proapoptotische Bak zu dessen Aktivierung beiträgt (Leu et al., 2004).

In nichtentarteten Zellen liegt p53 normalerweise nur in sehr niedrigen Konzentrationen im Zellkern vor. Aus dem Zufügen von Stress durch diverse Auslöser, z.B. Bestrahlung, Hypoxie, Hitzeschock, Entzug von Wachstumsfaktoren, Aktivierung von Onkogenen und Applikation von Zytostatika (Vogelstein, 2000; Vousden, 2002) resultiert jedoch ein starker Anstieg der Konzentration des Proteins, welches eine Interaktionsfähigkeit mit vielen Proteinen, der DNA und der RNA aufweist.

1.3.6 BCL- 2 und die Entstehung von Neoplasien

Wie bereits erwähnt, spielt eine fehlregulierte Apoptose eine der Schlüsselrollen bei der Entstehung von Tumoren. Nach der Schädigung der DNA (Initiation) zeigen sich die normalen Zellen erhöht sensitiv gegenüber Apoptose, z.B. bedingt durch eine gesteigerte Aktivität des Tumorsuppressors p53. Dieser Mechanismus stellt eine Kontrollinstanz gegen die allfällig auftretenden Mutationen in den verschiedenen Zelltypen dar. Nur auf diese Weise ist es dem Körper möglich, sich der allfälligen Entartung von Zellen zu erwehren.

Tritt jedoch ein Ausfall der „Suizid“- auslösenden bzw. - vermittelnden Mechanismen auf, kann die initiierte Zelle in die Promotion und letztlich in die Progression übertreten. Die erhöhte Sensitivität gegenüber Apoptoseinduktoren bedingt, dass die geschädigten Zellen einem enormen Selektionsdruck für den Verlust der Zelltodfunktionen ausgesetzt sind. Dieser führt nach Mutation dazu, dass diejenige Zelle, welche die meisten proapoptotischen Faktoren ausschalten kann, die besten Überlebenschancen aufweist.

Die Tatsache, dass die Apoptose eine wichtige Rolle im Tumorgeschehen spielt und BCL- 2 eine Schlüsselposition im Apoptosegeschehen innehat, berechtigt zu der Schlussfolgerung, dass BCL- 2- Proteinen bei der Entartung von Zellen eine besondere Bedeutung zukommen.

In der Tat implizieren die bisherigen Erkenntnisse, dass eine Veränderung des Verhältnisses von antiapoptotischen BCL- 2s zu proapoptotischen Vertretern insbesondere an der Genese von Kolontumoren beteiligt ist.

Diese Veränderung des „rheostat models“ kann zum einen durch eine Überexpression von antiapoptotischen BCL- 2s, welche in vielen neoplastischen Zellen nachgewiesen werden kann, hervorgerufen werden (Reed, 1999). Zum anderen kann aber auch eine Änderung in der Transkription bzw. eine Translation von mutierten, und somit funktionslosen, proapoptotischen BCL- 2 Proteinen zum entsprechenden Ergebnis führen, was z.B. in Neoplasien des „microsatellite mutator phenotype“ (MMP) zu beobachten ist. Diese Art der Entstehung, wie sie etwa 5 % aller Kolontumoren zu Eigen ist, enthält Mutationen an einfachen, sich wiederholenden Sequenzen diverser Gene. Solche Veränderungen gehen mit defekten DNA- Reparaturmechanismen der Zelle einher.

In über 50 % der MMP⁺ Kolonkarzinome kann eine solche, durch Mutationen hervorgerufene, Inaktivierung von Bax nachgewiesen werden, welche dem jeweiligen Tumor enorme Wachstumsvorteile beschert. In selteneren Fällen kann ein Wegfall von Bax auch in anderen Tumoren nachgewiesen werden (Rampino et al., 1997; Ionov et al., 2000).

Im Gegensatz zum bax- Gen, welches bereits sehr früh inaktiviert wird, werden Mutationen des bak- Gens erst in sehr späten Stadien gastrointestinaler Tumoren nachgewiesen (Kondo et al., 2000). Dies richtet den Fokus auf Bak als wichtiges Zielprotein der Chemoprophylaxe. Eine solche erlangt eine besondere Rolle für Individuen, die eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Entartungen im Verdauungstrakt aufweisen, wie z.B. Patienten, welche am erblichen, nicht-polypösen Kolontumor-Syndrom, einem MMP⁺ Tumor, leiden.

1.4 Die Bedeutung von Dickdarntumoren

Die klinische Relevanz der Apoptoseforschung im Dickdarntumorgeschehen von Tier und Mensch wird beim Zurateziehen von Statistiken sehr offensichtlich.

Wirft man einen Blick auf die Auflistung des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2002, so finden sich die bösartigen Neubildungen des Dickdarmes mit ca. 20500 Todesfällen bereits an sechster Stelle der zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland (s. Abb. 1.6). Die Bösartigkeit dieser Tumorarten besteht darin, dass sie eine hohe Metastasierungsrate aufweisen und die Erkrankung meist erst in einem

fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Desweiteren werden die in der Humanmedizin angebotenen Prophylaxemaßnahmen nicht in dem Maße wahrgenommen, wie es zum wirksamen Schutz vor der (insbesondere wegen auftretender Tochtergeschwulste) schlecht behandelbaren Erkrankung notwendig wäre. Eine einfache, möglichst wirksame Prophylaxe wäre diesbezüglich von höchstem Interesse und Vorteil.

Aufgrund des Fehlens eines organisierten Gesundheitswesens in der Tiermedizin ist es ungleich schwerer, vergleichbare Statistiken anzuführen. Dass das Thema „Kolonreale Neoplasien“ aber auch für die kleinen Haustiere, wie Hund und Katze, von diagnostischem, therapeutischem und prophylaktischem Interesse ist, zeigen diverse Auflistungen von Fallbeispielen bzw. die statistischen Auswertungen verschiedener veterinärmedizinischer Einrichtungen.

Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen ¹ insgesamt und nach Geschlecht 2002			
ICD-10 ² Pos.Nr.	Todesursache	Gestorbene insgesamt	
		Anzahl	Anteil an insgesamt in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	94 166	11,2
I21	Akuter Myokardinfarkt	64 218	7,6
I50	Herzinsuffizienz	56 955	6,8
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	39 433	4,7
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	39 105	4,6
C18	Bösartige Neubildung des Dickdarmes	20 363	2,4
J44	Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	19 402	2,3
J18	Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	18 693	2,2
C50	Bösartige Neubildung der Brustdrüse [Mamma]	18 010	2,1
E14	Nicht näher bezeichneter Diabetes mellitus	16 976	2,0

Abb. 1.6 : Statistik der zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland 2002. Bereits an sechster Stelle liegen die bösartigen Neubildungen des Dickdarmes (Quelle: Homepage des Statistisches Bundesamtes, Wiesbaden).

In einer dieser veröffentlichten Erhebungen wurden die Daten von 43 betroffenen Katzen und 573 an kolorektalen Tumoren leidenden bzw. verstorbenen Hunden ausgewertet (Nolte und Nolte, 2000). Wie diese Zahlen bereits implizieren, ist das Thema für Hunde von größerer Bedeutung als für Katzen.

In einer weiteren Auflistung, welche im Rahmen einer Dissertation am Institut für Veterinärmedizinische Pathologie der Justus- Liebig- Universität Giessen erstellt wurde, handelte es sich bei der Hälfte aller Umfangsvermehrungen im Darm von seziierten Hunden und Katzen um Adenokarzinome (45,9 %), gefolgt von Lymphosarkomen (20,8 %) und Fibrosarkomen (13,8 %). Erst auf den weiteren Rängen folgten benigne Tumoren. Nach mündlicher Mitteilung aus der Veterinärpathologie in Giessen ist aufgrund des ausgewerteten bioptischen Materials davon auszugehen, dass die Inzidenz von benignen und malignen Dickdarntumoren noch deutlich höher liegt.

Auch in der Tiermedizin sollte also ein starkes Interesse an einer wirksamen und einfach anzuwendenden Prophylaxe bestehen.

1.5 Konventionelle Prävention von Kolontumoren

Die bis dato am verbreitetsten Methoden der Prophylaxe von Entartungen im Dickdarm sind die aufwendige Rektokoloskopie, sowie die Chemoprophylaxe. Im Rahmen Letztgenannter kommen in Individuen mit erhöhter Prädisposition für derartige Tumoren die "Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs)" zum Einsatz. Zurzeit konzentriert sich der Einsatz auf die Wirkstoffe Sulindac, Piroxicam Indomethacin und Celecoxib in der Humanmedizin und Meloxicam in der Tiermedizin. Alle den NSAIDs zugehörigen Substanzen haben die Eigenschaft, die Cyclooxygenasen (COX) hemmen zu können und somit die Fähigkeit, die Bildung von Prostaglandinen und anderen Eicosanoiden zu behindern. Diese nehmen nicht nur eine Funktion als Entzündungsmediatoren ein, sondern sind auch in der Vermittlung von Wachstumssignalen im Tumorgeschehen von Bedeutung. Abb. 1.7 zeigt das Prinzip der COX. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, ist die proneoplastische Wirkung der Cyclooxygenasen hauptsächlich auf die induzierbare Isoform COX- 2 zurückzuführen. Da NSAIDs auch spezifische COX- Inhibitoren sein

können, wird im Zusammenhang mit der Tumorphylaxe besonderer Wert auf eine Inhibition der COX- 2 gelegt.

Diese Erkenntnisse über das antitumorogene Wirkprinzip der NSAIDs erklärt jedoch nicht, warum solche COX- Hemmer, die nachweislich keine oder nur eine geringe Hemmung der Isoform COX- 2 hervorrufen, trotzdem der autonomen Proliferation von Zellen entgegenwirken.

Diesbezüglich konnte von der Arbeitsgruppe von Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) der Nachweis des Einflusses von NSAIDs auf Bax und Bcl- X_L erbracht werden. Die Anwendung der COX- Hemmer ruft eine Veränderung der Bax : Bcl- X_L Ratio zugunsten des Bax hervor, was seine proapoptotische Wirkung zum Tragen kommen lässt (Zhang et al., 2000). Die Erkenntnis, dass ein einziges Protein eine solch wichtige Rolle bei der Induktion des Zelltodes einnehmen kann, war unerwartet und hat potentiell große Nachteile, wenn man die große genetische Variabilität von Kolontumoren und den entsprechend hohen Selektionsdruck für den Verlust einzelner Gene bedenkt.

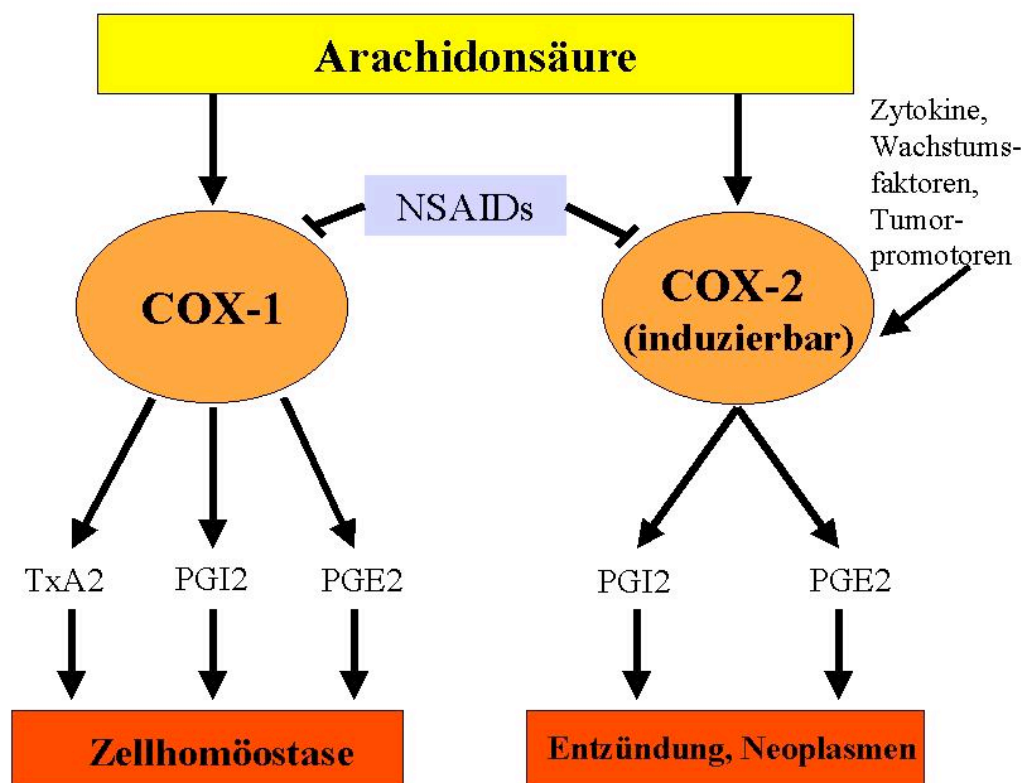


Abb. 1.7 : Aktivierung und Wirkung der Cyclooxygenasen. Während die Isoform COX- 1 auch unter physiologischen Bedingungen vorkommt, wird COX- 2 induziert. Dies geschieht durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren. Über die Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen werden die vielfältigen Effekte der COX vermittelt (nach Sinicrope und Gill, 2004)

So werden die NSAIDs durch den Mutations- bedingten Wegfall von Bax bereits im Anfangsstadium von Neubildungen unwirksam. Ein wünschenswertes Ziel wäre es also, einen Wirkstoff zum Einsatz zu bringen, welcher die Apoptose auf mehr als nur dem einen, Bax- abhängigen, Weg hervorrufen kann.

1.6 Resveratrol (RSV)

1.6.1 Entdeckung

Auf der Suche nach neuen Chemopräventiva wurde in den vergangenen Jahren der Fokus immer wieder auf die Entwicklung neuer COX- Hemmer gelegt. Da die meisten der bis dato bekannten NSAIDs Derivate pflanzlicher Inhaltsstoffe sind, wurden in den letzten Jahrzehnten hunderte von Pflanzenextrakten auf ihre Fähigkeit die COX zu inhibieren analysiert.

Der Extrakt der 1974 in Peru gesammelten Leguminose *Senna quinquangulata* Rich., zeigte dabei eine ausgeprägte Hemmung des Enzyms. Durch weitere Analysen konnte die dafür maßgeblich verantwortliche Substanz als C₁₄H₁₂O₃ Körper und später als Resveratrol identifiziert werden (s. Abb. 1.8)

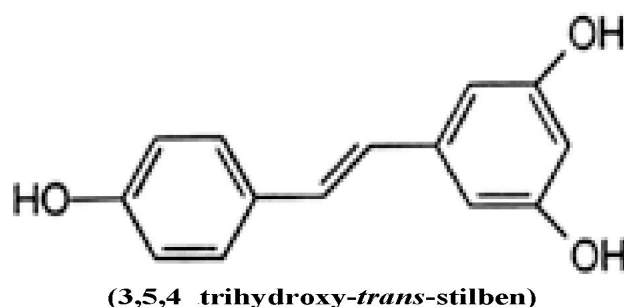


Abb. 1.8 : Strukturformel von Resveratrol. Die dem Östrogen ähnliche Substanz wird von vielen Pflanzen als Phytoalexin gebildet.

Das Stilbenderivat Resveratrol wird von Pflanzen als Phytoalexin, also als Abwehrstoff gegen z.B. Schimmelpilzbefall synthetisiert. Bis heute konnte Resveratrol in über 72 Pflanzenspezies, verteilt auf verschiedene Genera und Familien, nachgewiesen werden. Viele davon sind Bestandteil unserer Ernährung, wie z.B. Erdnüsse, Maulbeeren, Trauben und ergo auch Wein (Jang et al., 1997).

1.6.2 Die Wirkungen von Resveratrol

1.6.2.1 Antiinflammatorisch

Zunächst wurde Resveratrol lediglich als potenter Entzündungshemmer angesehen. Im Rattenmodell („carrageenan model“) konnte nach Applikation einer starken entzündungsauslösenden Substanz die Ödematisierung der Pfoten durch Resveratrol stärker inhibiert werden als durch Phenylbutazon (Jang et al., 1997). Diese antiinflammatorische Wirkung ist auf eine verminderte Synthese von Prostaglandinen und anderen Eicosanoiden zurückzuführen, was eine direkte Folge der COX- Inhibition war.

Desweiteren beeinträchtigt Resveratrol die Funktion der an Entzündungen maßgeblich beteiligten Leukozyten. So konnte beobachtet werden, dass der Wirkstoff in der Lage war, eine Degranulierung von neutrophilen Granulozyten, sowie eine Aktivierung von Zytokin- sezernierenden Makrophagen zu verhindern (Rotondo et al., 1998; Tsai, 1999; Wadsworth, 1999).

Bezüglich der Effekte auf die neutrophilen Granulozyten und auf Makrophagen ist anzumerken, dass von einer spanischen Arbeitsgruppe kürzlich in einem Ratten-Colitis- Modell nachgewiesen wurde, dass die orale Aufnahme von Resveratrol auf eine durch die Instillation von Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) hervorgerufene Colitis einen lindernden Effekt erzielte. Histologisch wurde ein Rückgang der neutrophilen Infiltrate in die Darmwand beobachtet, was wahrscheinlich auf eine Inhibition der COX zurückzuführen war (Martin et al., 2004). Dies unterstreicht die Relevanz von Resveratrol als Entzündungshemmer, der in der klinischen Anwendung auch bei der Behandlung von chronisch- entzündlichen Prozessen eine Rolle spielen könnte. Für die Tiermedizin wäre dies insbesondere bei der Behandlung der Intestinal Bowel Disease von Hund und Katze von Vorteil, die aus

neutrophilen oder monozytären Infiltraten ohne die Einwirkung einer erkennbaren Noxe in die Darmschleimhaut resultiert.

1.6.2.2 Cardioprotektion

Im Rahmen des „oxidative stress“ von Zellen kommt es zur exzessiven Produktion von „Reactive Oxygen Intermediates“ (ROI), welche durch ihre Oxidationsfähigkeit zu Schädigungen von Lipiden (ergo auch Membranen!), Proteinen und Nukleinsäuren beitragen können. Als Beispiel seien die „Low Density Lipoproteins“ (LDL) genannt. Als oxidierte Radikale tragen sie zur Thrombozytenaggregation und somit zur Genese von vaskulären Erkrankungen, wie der Atherosklerose bei. Diese Effekte werden physiologisch durch sogenannte Antioxidantien, Substanzen, die als Radikalfänger fungieren, verhindert. Auch Resveratrol weist solche protektiven Eigenschaften auf (Miller und Rice-Evans, 1995).

Desweiteren beeinträchtigt Resveratrol die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen. Dieses trägt in hohen Konzentrationen zur Zerstörung der Gefäße bei, in niedrigen Konzentrationen weist es jedoch eine vasodilatatorische Wirkung auf, ebenfalls eine Möglichkeit, dem krankhaften Gefäßverschluss entgegenzutreten (Hung et al., 2000; Hattori et al., 2002).

Die oben erwähnte Aggregation der Blutplättchen wird von Resveratrol noch auf einem weiteren Weg, nämlich dem der COX- Inhibition (gleichbedeutend mit einer verminderten Thromboxansynthese) verhindert (Orsini, 1997; Olas, 2001).

1.6.2.3 Anticancerogen

Wie bereits erwähnt, ist die Cancerogenese ein Prozess, der durch ein dysreguliertes Wachstum und durch eine Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion ermöglicht wird. In nichtentarteten Zellen gibt es Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus mittels Proteinen, wie dem Tumorsuppressor p53, Rb oder p21^{Waf1/Cip1} reguliert wird. Bei einem Ausfall dieser Proteine können sich Schäden an der DNA manifestieren und in die nächsten Zellgenerationen mit übernommen werden. Dies entspricht der Phase der Initiierung von Tumoren (s.u.).

Dieser Art der ungehinderten Proliferation fehlerhafter Zellen kann Resveratrol durch Induktion eines Zellzyklusarrests in der S- Phase (Bernhard et al., 2000), am

Übergang von G1/S- Phase (Bhat und Pezzuto, 2002) und am Übergang von S/G2-Phase (Ragione et al., 1998) entgegenwirken.

Besonderes Aufsehen erregten Erkenntnisse, welche andeuteten, dass Resveratrol in der Lage ist, auf alle drei Stadien der Tumorgenese - Initiation, Promotion und Progression (s. Abb. 1.9) - , anticancerogene Effekte auszuüben.

Die Initiation, welche durch Schäden am genetischen Material der Zelle gekennzeichnet ist, kann durch die antioxidierenden, antimutagenen und Enzym-induzierenden Eigenschaften von Resveratrol beeinflusst werden.

Als Radikalfänger verhindert der Wirkstoff die Bildung von freien Radikalen, einem der Hauptverantwortlichen für Schäden an der DNA (Sharma et al., 1994). In einem Versuch an *Salmonella typhimurium* wurde gezeigt, dass diese, unter dem Einfluss von Resveratrol, weniger Mutationen nach Behandlung mit 7,12-dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) aufwiesen als kontrollbehandelte Bakterien (Shamon et al., 1995). Zu guter Letzt kommt in dieser Phase der Tumorentwicklung auch die Fähigkeit von Resveratrol zum Tragen, Phase II- Enzyme induzieren zu können. Diese Enzyme entgiften potentielle Cancerogene durch Metabolisierung (Zhang et al., 1994).

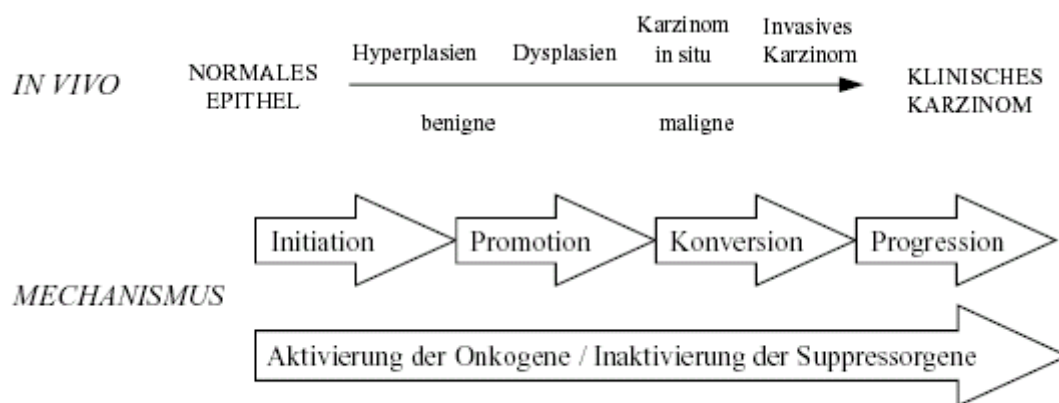


Abb. 1.9 : Stadien der Tumorgenese. Durch Schäden an der genetischen Information der Zelle wird diese initiiert. Die daraus resultierende, noch benigne hyperplastische Zelle durchläuft danach das Stadium der Promotion und gelangt letztendlich durch die Konversion in die Progression. Hier erlangt die Zelle die Malignität.

Die Promotion, welche durch morphologische Veränderungen der Zelle in Erscheinung tritt, wird hauptsächlich durch die COX- hemmende Wirkung von Resveratrol unterdrückt. Aus dieser ergibt sich eine Reduktion der Synthese von

Prostaglandinen, von welchen einige als Promotoren an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind (Jang et al., 1997).

Als drittes und finales Stadium der Entartung wird die Progression angesehen. In dieser Phase zeigen die initiierten und promovierten Zellen nach ihrer Konversion ein autonomes Wachstum, geringe Differenziertheit und die Fähigkeit zur Metastasierung.

Auch in diesem späten Stadium konnte an entarteten leukopoetischen Zellen (HL 60) ein erstaunlicher Effekt von Resveratrol beobachtet werden. Das Stilbenderivat war in der Lage, diesen Zellen zur Wiedererlangung der Differenzierungsfähigkeit zu verhelfen (Suh et al., 1995).

Wichtiger als die *in vitro* Versuche waren allerdings die Ergebnisse der *in vivo* Analysen, die an Maus- Modellen erzielt werden konnten. Im Maus-Gesäugetumormodell (Moon et al., 1990) und im Maus- Hauttumormodell (Jang et al., 1997) war eine deutliche Reduktion der Inzidenz von Tumoren bzw. von präneoplastischen Läsionen in mit Resveratrol- behandelten Mäusen im Vergleich zu kontrollbehandelten Individuen festzustellen. Desweiteren zeigte sich, dass die Substanz für nichtentartete Zellen gänzlich untoxisch war.

Wie oben erwähnt, spielt neben der Dysregulation der Zellproliferation auch eine fehlregulierte Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Neubildungen. Die Mechanismen, über die Resveratrol zur Apoptoseinduktion beiträgt, sind bis dato nur teilweise aufgeklärt.

Eine direkte Einleitung der Apoptose über den Todesrezeptorweg wird zwar von manchen Autoren beschrieben (Clement et al., 1998), konnte aber durch andere Arbeiten widerlegt werden (Wieder et al., 2001; Bernhard et al., 2000).

Nach neuesten Erkenntnissen scheint Resveratrol in Kolontumorzellen der Zelllinie HCT116 zu einer Aneinanderlagerung von CD95 (/Fas)- Todesrezeptoren auf der Zellmembran zu führen, nicht aber zu einer gesteigerten Expression des Rezeptors. Die Neuformierung der Rezeptoren sensibilisiert diese gegenüber dem entsprechenden Liganden, ohne den in diesem Fall kein Zelltod ausgelöst wird. Es ist also höchstens von einem indirekten Effekt von Resveratrol auf den Todesrezeptor- vermittelten Weg der Apoptose in Kolontumorzellen auszugehen (Delmas et al., 2004).

Die bedeutendste Art der Resveratrol- vermittelten Apoptose ist der mitochondriale Weg. Auch diesbezüglich ist bis dato nur zum Teil bekannt, was die Substanz an den

Mitochondrien bewirkt. Es scheint aber, dass ihr verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung stehen, den Zelltod herbeizuführen.

Bezüglich des p53- Tumorsuppressors kann der Einfluss auf die Apoptose sowohl p53- vermittelt sein (Huang et al., 1999) als auch unabhängig davon erfolgen (Mahyar-Roemer et al., 2001).

Einer der Hauptangriffspunkte von Resveratrol sind die proapoptotischen BCL- 2s Bax und Bak. In einem vorangegangenen Projekt unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein Wegfall von Bax die Resveratrol- vermittelte Apoptose abschwächt, sie aber nicht völlig zum Erliegen bringt. Diese Untersuchungen wurden an den Kolontumor- Zelllinien HCT116 und deren Derivat HCT116 Bax-/-, in der beide bax- Allele durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden waren (Arbeitsgruppe von Dr. Bert Vogelstein, Johns Hopkins University, Baltimore, USA), durchgeführt.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Resveratrol nicht zu einer Überexpression von Bax beiträgt, sondern dessen Translokation an die äußere Mitochondrienmembran bewirkt (Mahyar-Roemer et al., 2002). Allerdings wird, wie oben gesagt, in Kolontumoren Bax häufig früh inaktiviert. Es war deshalb interessant zu fragen, welche(r) weitere(n) Faktor(en) zur Resveratrol- induzierten Apoptose beitragen.

Einen Anhaltspunkt darüber, welcher Faktor neben Bax an der mitochondrialen Apoptose zusätzlich beteiligt ist, liefert zum einen die Kenntnis homologer proapoptotischer BCL- 2 Proteine (Bak und Bok) sowie eine Forschungsarbeit am Mausmodell, in welchem transgene Mäuse zum Einsatz kamen. Diese konnten weder Bax noch Bak exprimieren. Die analysierten Zelllinien dieser Mäuse zeigten sich resistent gegenüber durch verschiedene Stimuli hervorrufbarer Apoptose (Wei et al., 2001), was auf eine wichtige ergänzende Rolle von Bak in der induzierbaren Apoptose hinweist.

Die Frage, warum Resveratrol insbesondere bei der Prävention von Darmtumoren zum Einsatz kommen könnte, wird durch eine Arbeit über die pharmakologischen Eigenschaften des Wirkstoffes beantwortet (Gescher und Steward, 2003). Darin wird gezeigt, dass selbst bei Verabreichung einer oralen Dosis, die dem 20- fachen einer durch moderaten Weingenuss erreichbaren Menge entspricht, ein Plasmaspiegel von maximal lediglich 20 nM der biologisch aktiven *trans*- Form von Resveratrol und ca. 2 µM Gesamt- Resveratrol zu messen war. Zusätzlich zu dieser recht geringen

Resorptionsrate wird das Maximum zwar bereits nach 5 bis 10 Minuten postoraler Aufnahme erreicht, hat aber eine Halbwertszeit von nur 12 bis 15 Minuten.

Da zur Wachstumsinhibition 5 bis 10 μM und zur Induktion der Apoptose 32 bis 100 μM Plasmakonzentration benötigt werden, und diese über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden muss, erscheint es einleuchtend, dass nur bei oralem Applikationsschema eine lokale Anwendung von Resveratrol den gewünschten Erfolg erzielen kann. Aufgrund der Tatsache, dass der pflanzliche Inhaltsstoff Resveratrol ein Bestandteil der täglichen Ernährung ist, liegen die Tumoren des Verdauungstraktes als chemopräventiver Einsatzort von Resveratrol nahe. Neuere Untersuchungen an Ratten zeigen zudem, dass selbst eine orale Dosis von 0,3 g/KgKGW/ Tag mit keiner messbaren Toxizität verbunden ist (Crowell et al., 2004).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Maligne kolorektale Neoplasien sind neben den Tumoren der Mundhöhle die häufigsten Entartungen im Verdauungsbereich der kleinen Haustiere, insbesondere des Hundes. In der Humanmedizin stellen sie in Deutschland die sechsthäufigste Todesursache dar. Aufgrund der äußerst schlechten Prognose für den Patienten nach Diagnosestellung liegt ein Hauptaugenmerk auf der Chemoprävention. Neben den bis dato genutzten, und durch bax- Mutationen der Tumoren schnell inaktivierbaren, nichtsteroidalen Antiphlogistika betrachtet man in der heutigen Zeit den 1974 erstmals isolierten Wirkstoff namens Resveratrol als potente Alternative in der Chemoprophylaxe.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten die Fähigkeit des Phytoalexins Resveratrol, die mitochondriale Apoptose durch Aktivierung und Translokation des zytosolischen proapoptotischen BCL- 2- Proteins Bax an die äußere Mitochondrienmembran zu induzieren. Diese Rekrutierung von Bax kann sowohl abhängig als auch unabhängig von p53 erfolgen, was bedeutend ist, da viele Tumoren kein funktionelles p53 mehr exprimieren.

In Versuchen an Derivaten der Kolontumorzelllinie HCT116, in denen das bax- Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden war, wurde eine verminderte proapoptotische Wirksamkeit von Resveratrol festgestellt. Es konnte aber auch

gezeigt werden, dass ein Resveratrol- induzierter Zelltod mit verzögerter Kinetik beobachtet werden kann, was die Existenz anderer pathways impliziert, über die Resveratrol seine Wirkung ausüben kann. Dies beschert der Substanz einen potentiell enormen Vorteil gegenüber den herkömmlichen NSAIDs, welche lediglich über eine Veränderung des Verhältnisses Bax : Bak- Antagonisten Einfluss ausüben können.

Dass es angezeigt ist, dem ebenfalls proapoptotischen BCL- 2- Protein Bak einige Untersuchungen im Rahmen der Resveratrol- induzierten Apoptose zu widmen, beweisen Arbeiten an Mausmodellen, welche bei einem Ausfall beider Proteine eine vollständige Resistenz der Knockout- Zellen gegen diverse apoptoseinduzierende Stimuli zeigten.

Vor diesem Hintergrund definierten sich die Ziele dieser Arbeit. Es sollte untersucht werden, ob

1. Resveratrol in der Lage ist, Bak zu aktivieren und somit zu einer Oligomerisierung des Proteins beizutragen.
2. eine solche Oligomerisierung zu einer Cytochrom c- Freisetzung aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien und somit zu einer Caspasen-abhängigen Apoptose führt. Also die Klärung der Frage, ob Resveratrol auch in Abwesenheit von Bax über Bak Apoptose zu induzieren vermag.
3. eine eventuelle Aktivierung von Bak abhängig oder unabhängig von p53 erfolgt.
4. ein Ausfall eines der beiden proapoptotischen BCL- 2 Proteine Bax und Bak durch das jeweils verbleibende Protein kompensiert werden kann.
5. der Wegfall beider Proteine in einer vollständigen Resistenz gegenüber der Resveratrol- induzierten Apoptose resultiert.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien (in Reinstform)	Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Seakem (Rockland, ME, USA), Sigma
Resveratrol	Alexis Biochemicals

2.2 Puffer

PBS	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Na/K- Phosphat pH 7,5	10 mM
5x Ladepuffer für DNA- Agarosegelelektrophorese	EDTA	50 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
50x TAE-Puffer	Tris/HCl (pH 8,0)	2 M
	Eisessig	1 M
	EDTA	0,05 M
		ad pH 8,0

2.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden über die Firma New England Biolabs (NEB) bezogen.

Taq- Polymerase	Sigma
DNase (RNase- frei)	Roche
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen

2.4 Größen- und Molekulargewichtsmarker

2.4.1 DNA- Größenmarker

Zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger DNA- Fragmente wurde der "1 kb Plus- DNA – Ladder" der Firma Invitrogen verwendet. Dieser Marker ist zur Bestimmung von Fragmenten der Größe zwischen 0,1 und 12 kBP geeignet.

Fragmentgrößen (kBP): 12000 / 11000 / 10000 / 9000 / 8000 / 7000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3000 / 2000 / 1650 / 1000 / 850 / 650 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

2.4.2 Protein- Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde der "Peqlab Gold Prestained Protein Marker IV" der Firma Peqlab eingesetzt. Er enthält Proteine der folgenden Molekulargewichte:

180 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa und 10 kDa

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Antikörper		Verdünnung
DO- 1 (Calbiochem)	Anti- p53 monoklonaler Antikörper; IgG (Maus)	1:2000
Bak Ab-2 (Oncogene)	Epitop: N-Terminus; monoklonaler Antikörper; IgG (Maus)	1:1000
Bak (Pharmingen)	Polyklonales Kaninchen-Serum	1:1000
Bak (G23) (SantaCruz)	Monoklonaler IgG (Maus) Antikörper	1:1000
Anti- β- Aktin (Sigma)	Monoklonaler Anti- β - Aktin Antikörper (Maus)	1:5000
Cytochrom c (BD Biosciences)	Monoklonaler Antikörper; IgG (Maus)	1:1000
Cytochrom- Oxidase IV (Molecular Probes)	Monoklonaler Antikörper (Maus)	1:500
Caspase- 9 (aktiv.) (BD Pharmingen)	Monoklonaler Antikörper; IgG (Maus)	1:1000
HtrA2/Omi (Alexis Biochemicals)	Polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	1:1000
AIF (Santa Cruz)	Monoklonaler Antikörper; IgG (Maus)	1:300

2.5.2 Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen-POX (Sigma)	Peroxidase- gekoppelter anti- Kaninchen Antikörper	1:2000
Anti-Maus-POX (Sigma)	Peroxidase- gekoppelter anti- Maus Antikörper IgG	1:2000

2.6 Bakterienstämme

Zur Plasmidvermehrung wurde der *E.coli*- Stamm pMosBlue eingesetzt.

2.7 Nährmedien zur Kultivierung von *E.coli*

LB- Medium: Luria broth base (GIBCO)	2,5 % (w/v)
LB- Platten: Luria's agar (GIBCO)	3,75 % (w/v)

Zur Selektion wurde jeweils Ampicillin (Bayer/Leverkusen; 100 mg/ml) in einer Endkonzentration von 50 µg/µl verwendet.

2.8 Lösungen zur präparativen Plasmid- DNA- Isolierung

Alle Plasmidaufreinigungen erfolgten mit dem „Plasmid DNA Purification“- Kit von Macherey- Nagel.

Puffer S1 (Resuspensionspuffer)	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RnaseA	100 µg/ml
		pH 8,0
Puffer S2 (Lysispuffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer S3 (Neutralisationspuffer)	Kac	2,8 M pH 5,1
Puffer N2 (Äquilibrierungspuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	900 mM

	Triton X-100	0,15 %
		ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄
Puffer N3 (Waschpuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	1,15 M
		ad pH 6,3 mit H ₃ PO ₄
Puffer N5 (Elutionspuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	1 M
		ad pH 8,5 mit H ₃ PO ₄

2.9 Zelllinien

2.9.1 HCT116

Humane Kolonkarzinom- Zelllinie mit Wildtyp p53.
(American Type Culture Collection ATCC CCL-247)

2.9.2 HCT116 Bax^{-/-}

Stammt von der oben genannten Zelllinie ab, das bax- Gen wurde durch gerichtete, homologe Rekombination ausgeschaltet; die Zelllinie wurde vom Labor Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, USA bezogen.

2.9.3 HCT116 p53^{-/-}

Stammt ebenfalls von der oben genannten Zelllinie ab. Auch das p53- Gen wurde durch gerichtete, homologe Rekombination ausgeschaltet; die Zelllinie wurde uns vom Labor Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, USA zur Verfügung gestellt.

2.10 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Mc Coy's 5A- Medium with Glutamax	Gibco
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Trypsin /EDTA- Lösung	PAA Laboratories
Puromycin (Stammlösung 1 mg/ml)	Sigma

2.11 Lösungen zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten

2x Ladepuffer für SDS- Gele	Tris/HCl	100 mM
	DTT	200 mM
	SDS	4 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Glycerin	20 % (w/v)

2.12 Lösungen für die SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

1x Laufpuffer für SDS- PAGE	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
		ad pH 8,3

2.13 Lösungen für den Western- Blot

Western- Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
Amidoschwarz- Färbelösung	Isopropanol	25 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)
	Naphtol- Blue- Black	0,05 % (w/v)
	(Amidoschwarz)	
Amidoschwarz- Entfärbelösung	Isopropanol	10 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)

2.14 Lösungen zur Mitochondrien- Isolierung aus eukaryotischen Zellen

TD- Puffer	NaCl	134 mM
	KCl	5 mM
	Tris (pH 7,5)	25 mM
Ca- RSB- Puffer	NaCl	10 mM
	CaCl ₂	1,5 mM
	Tris (pH 7,5)	10 mM
2,5x MS- Puffer	Mannitol	0,525 M
	Sucrose	175 mM
	EDTA	12,5 mM
	Tris (pH 7,5)	12,5 mM

2.15 Vektoren und siRNAs

2.15.1 Vektoren

2.15.1.1 Der Expressionsvektor pSUPER

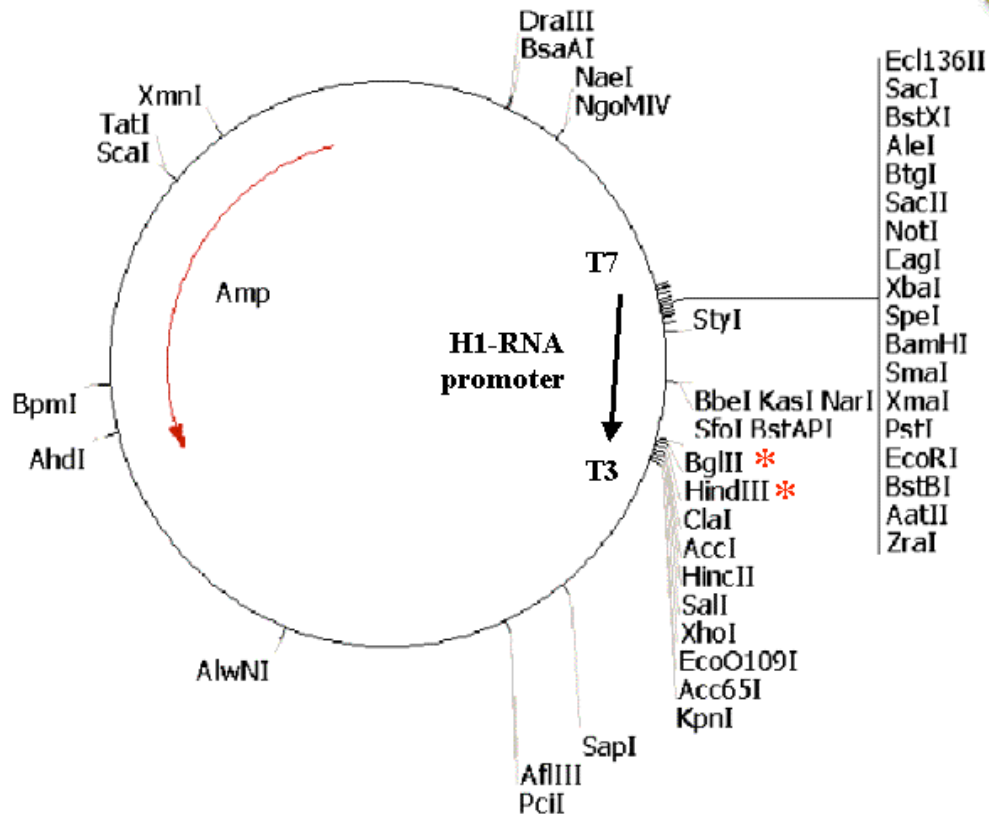


Abb. 2.1 : Der Vektor pSUPER.

Die Stellen BglII und HindIII (mit je einem Sternchen markiert) werden für den Einbau der Nukleotidsequenz verwendet. Während der Ligation wird die BglII Stelle zerstört. Der Vektor exprimiert eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker. Der Vektor wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Reuven Agami, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, zur Verfügung gestellt (Brummelkamp et al., 2002).

2.15.1.2 Der retrovirale Vektor pBabe- puro

Der Vektor pBabe- puro besitzt zur Selektion in eukaryotischen Zelllinien ein Puromycin- Resistenzgen, welches unter der Kontrolle des SV40 Virus- Promotors (SV40) steht. An beiden Enden des Promotors befindet sich je ein Long Terminal Repeat (LTR). Um eine Selektion in Bakterienzellen durchführen zu können, trägt der Vektor zusätzlich eine für ein Ampicillin- Resistenzgen kodierende Sequenz.

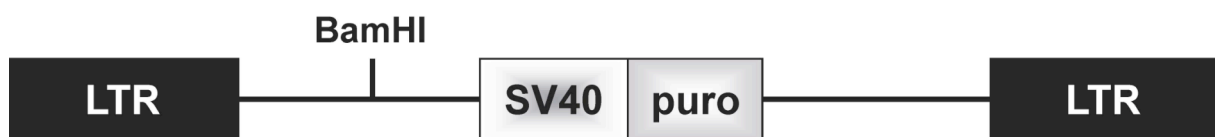


Abb. 2.2 : Der Vektor pBabe- puro.

2.15.1.3 Der fluoreszenzgekoppelte Vektor pEGFP-C1

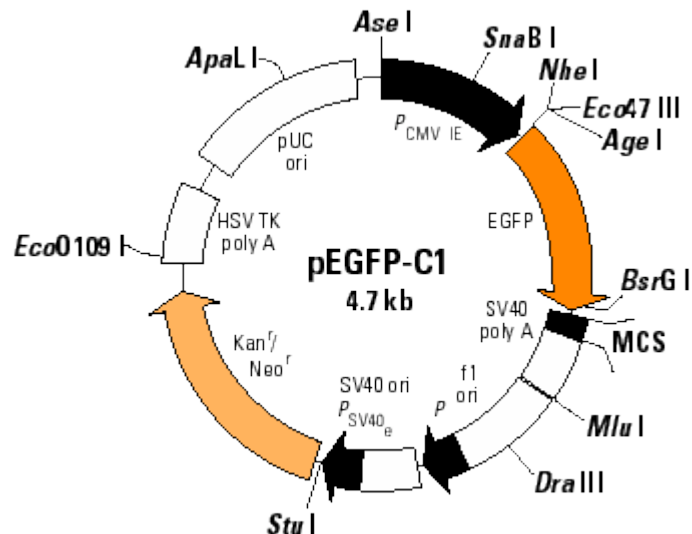


Abb. 2.3 : Der Vektor pEGFP- C1.

Der Vektor pEGFP-C1 enkodiert eine rotleuchtende Variante des Wildtyp GFP. Das Emissionsmaximum der Fluoreszenz liegt bei 507 nm.

Eine weitere Verwendung fand der Vektor als Expressionsplasmid für das humane Bak Protein, womit die Spezifität der vorhandenen Antikörper getestet werden sollte. Der Vektor mit der bereits eingefügten Sequenz für das humane Bak Protein wurde

uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Grant McFadden, University of Western Ontario and Robarts Research Institute, Canada zur Verfügung gestellt (Wang et al., 2004).

2.16 Synthetische Oligonukleotide

2.16.1 Bak siRNA und Kontroll- siRNA

Sequenz der Doppelstrang siRNA des humanen Bak Proteins:

r(CCGACGCUAUGACUCAGAG)dTT

r(CUCUGAGUCAUAGCGUCGG)dTT

Die Vorlage für die Auswahl dieser Sequenz stammt aus einer Arbeit der Gruppe Wafik S. El- Deiry, Laboratory of Molecular Oncology and Cell Cycle Regulation, Howard Hughes Medical Institute, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA (Wang und El-Deiry, 2003)

Sequenz der Kontroll (non- silencing) siRNA

r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)dTdT

r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)dTdT

Fluoreszin (FITC)- gekoppelte siRNA zur Kontrolle der Transfektionseffizienz

Die Sequenz der Fluoreszin- gekoppelten siRNA entspricht der der Kontroll- siRNA. Alle siRNA Produkte wurden von der Firma Qiagen bezogen.

2.16.2 Sequenzen für pSUPER- Vektor

Bak Protein

Forward:

"Sense" Orientierung "Hairpin" "Anti- Sense" Orientierung
 gatcccc**GGTAGCCCAGGACACAGAG**ttcaagaga**CTCTGTGTCCTGGGCTACC**tttttg
 gaaa

Reverse:

agcttttccaaaa**GGTAGCCCAGGACACAGAG**tctcttgaa**CTCTGTGTCCTGGGCTACC**
 ggg

Kontrolle

Forward:

gatcccc**AAGGAATAGACGCGCGCGC**ttcaagaga**GCGCGCGCGTCTATTCTT**tttttg
 aaa

Reverse:

agcttttccaaaa**AAGGAATAGACGCGCGCGC**tctcttgaa**GCGCGCGCGTCTATTCTT**
 ggg

Die 64mer- Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen bezogen.

2.16.3 □□ Sequenz für die Überexpression des humanen Bak Proteins

Die Vorlage für das humane Bak Protein wurde durch Reverse- Transkriptions- PCR (RT- PCR) aus der cDNA von HEK293T Zellen gewonnen und in den Vektor pEGFP-C1 eingebaut. Beides wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Grant McFadden, University of Western Ontario and Robarts Research Institute, Canada zur Verfügung gestellt (Wang et al., 2004).

3 Methoden

3.1 DNA- Techniken

3.1.1 Modifikationen von DNA

3.1.1.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur gezielten Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen, welche palindromatische Sequenzen erkennen und schneiden, unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen eingesetzt. Die einzusetzende Enzymmenge wird durch DNA- Konzentration und Enzymaktivität bestimmt. Aufgrund des hohen Glycin- Gehaltes der Enzymlösung beträgt die einzusetzende Enzymmenge 1/10 des Reaktionsansatzes.

3.1.1.2 Dephosphorylierung von DNA- Enden

Um die Rezirkularisierung von zuvor mit Restriktionsenzymen linearisierten DNA-Doppelsträngen zu verhindern, wurde die Phosphatgruppe an den 5'- Enden der DNA durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestinal phosphatase“, CIP, Roche, Mannheim) abgespalten. Eine Ligation kann im Anschluss nur noch mit dem phosphorylierten Insert erfolgen. Die linearisierte DNA wurde mit 20 U Alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C inkubiert.

3.1.1.3 Anlagerung der 64mer- Oligonukleotide

Die 64mer- Oligonukleotide wurden zunächst in 50 µl Wasser gelöst und zu gleichen Volumina (1 µl) zu 48 µl "Annealing buffer" (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH pH 7,4, 2 mM Mg-acetat) hinzugegeben. Die Mixtur wurde dann für 4 min bei 95°C erhitzt, danach bei 70°C 10 min lang inkubiert und LANGSAM auf 4°C herabgekühlt.

3.1.1.4 Ligation von DNA- Fragmenten

Mit Hilfe der T4- DNA- Ligase können die Enden zweier Nukleinsäuremoleküle *in vitro* verknüpft werden. Dieses Enzym katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3'- Hydroxy- und einem 5'- Phosphatende und wird für die Bildung einer intakten doppelsträngigen DNA benötigt. Die Enden der beiden zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle müssen dabei kompatibel sein. Zur Ligation wurden der CIP- behandelte Vektor und die Insert-DNA in äquimolarem Verhältnis eingesetzt und mit Ligase- Puffer sowie 1 µl (40 U) Ligase (New England Biolabs) für 2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert. Mit dem Ligationsansatz wurden Bakterien des *E. coli*- Stammes pMosBlue transformiert. Zur Überprüfung der Integration der Sequenz in das Plasmid kann ein EcoRI- HindIII Verdau durchgeführt werden.

3.1.2 Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien: Minipräparation

Zur schnellen Isolierung von Plasmid- DNA dient die so genannte Minipräparation. Zwar liefert sie nur geringe Mengen an DNA, diese reicht jedoch zur Analyse von Klonierungsschritten aus. Die Aufbereitung der Plasmid- DNA erfolgt bei dieser Methode über Lyse durch Kochen.

1,5 ml einer 3 ml- Übernachtkultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 5000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 350 µl STET- Puffer resuspendiert und 25 µl Lysozym- Lösung zur Auflösung der Bakterienzellwände zupipettiert. Dieser Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zur Lyse der Bakterien für 45 sec bei 100°C gekocht und danach sofort für 5 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13000 rpm, 10 min) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die darin enthaltene Plasmid- DNA durch Zugabe von gleichem Volumen Phenol- Mix gereinigt. Anschließend wurde die Plasmid- DNA durch Zugabe des gleichen Volumens 100 %igen Isopropanols bei 4°C in einer Tischzentrifuge (13000 rpm, 60 min) gefällt. Das DNA- Pellet wurde mit 500 µl

eiskalten, 70 %igen Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und unter Vakuum getrocknet (Speed- Vac Concentrator, Savant, 10 min). Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl TE- Puffer (mit 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und bei 4°C gelagert.

STET- Puffer	Sucrose	8 % (w/v)
	Triton X-100	0,5 % (w/v)
	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	50 mM

Lysozymlösung: 10 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

3.1.3 Präparative Plasmid- DNA- Isolierung

Bei Bedarf großer Mengen hochreiner Plasmid- DNA wurde die Aufbereitung mittels alkalischer Lyse und Ionenaustauschchromatographie an Nucleobond®- Säulen (Macherey- Nagel) nach Firmenvorschrift durchgeführt.

Mit Hilfe der Nucleobond®- Säulen (AX- 100) können 100 ml- Bakterienkultur bei erwarteter DNA- Ausbeute von 20- 100 µg aufgearbeitet werden.

Dazu wurde eine Übernachtskultur plasmidtragender Bakterien bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor GS 3, 5000 rpm, 10 min), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das im Puffer enthaltene SDS löst die bakterielle Zellwand auf und führt zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung der Zellbestandteile. NaOH denaturiert die chromosomale und die Plasmid- DNA sowie die Proteine. Durch anschließende Zugabe von 4 ml Puffer 3 und einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde das Lysat neutralisiert. Die kleinere, kovalent geschlossene, Plasmid- DNA renaturiert wieder und bleibt in Lösung, während die chromosomale Wirts- DNA präzipitiert. Der Ansatz wurde bei 4°C abzentrifugiert (13000 rpm, 25 min), durch einen Papierfilter filtriert und anschließend auf die zuvor mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibrierte Nucleobond®- Säule gegeben. Aufgrund der Salz- und pH- Bedingungen im Lysat bindet nur die Plasmid- DNA an die Säule und wird zurückgehalten. Nach dem Waschen der Säule zur Entfernung

von Proteinen mit 2 x 5 ml Puffer N3 wurde die Plasmid- DNA mit 5 ml Puffer N5 eluiert und mit 3,5 ml Isopropanol (100 %) bei Zentrifugation (13000 rpm, 1h, 4°C) gefällt. Das erhaltene Pellet wurde mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bidest} gelöst.

3.1.4 Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Absorptionsspektroskopie erlaubt die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung. Dabei ist zu beachten, dass Nukleinsäuren in Lösung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert einzelsträngige DNA aufgrund des Hyperchromizitätseffektes stärker als doppelsträngige DNA. Eine gemessene optische Dichte bei 260 nm von 1,0 (Schichtdicke der Küvette: 1 cm) entspricht:

Bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml,

Bei einzelsträngiger DNA und RNA einer Konzentration von 40 µg/ml,

Bei einzelsträngigen Oligonukleotiden einer Konzentration von 33 µg/ml.

Proteine, die als Verunreinigung in DNA- Lösungen auftreten, besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} ermöglicht es, den Reinheitsgrad einer nukleinsäurehaltigen Lösung einzuschätzen. Bei einer reinen DNA- Lösung wird ein Wert zwischen 1,65 - 1,85 erreicht. Höhere Werte sind auf RNA- Verunreinigungen, niedrigere Werte auf Proteinverunreinigung und Phenolreste zurückzuführen.

3.1.5 Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase- Kettenreaktion ist ein *in vitro*- Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Abfolge aus einem Gemisch von Nukleinsäure- Molekülen. Es werden dabei die Eigenschaften von DNA- Polymerasen zur Hilfe genommen, die, ausgehend von einem DNA- Einzelstrang als Matrize (Template), einen neuen komplementären Strang synthetisieren können.

In einem ersten Schritt wird die zunächst doppelsträngige DNA bei 94°C vollständig denaturiert, d.h. in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). In einem zweiten Schritt erfolgt nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf eine geeignete Temperatur (variiert je nach Primer) die spezifische Anlagerung der Oligonukleotide an den jeweiligen Einzelstrang (Annealing). Die Oligonukleotide werden dabei so gewählt, dass sie jeweils Start- und Endpunkt der zu amplifizierenden Sequenz definieren. Die angelagerten Oligonukleotide bilden einen kurzen doppelsträngigen DNA- Bereich mit einem freien 3'- Hydroxy- Ende, den die Polymerase für ihre Verlängerungsreaktion benötigt. In Anwesenheit von Desoxynukleotiden (dNTP's) werden nun in einem dritten Schritt die mit Primern verbundenen Matrizen zu einem Doppelstrang aufgefüllt (Extension). Die neusynthetisierten DNA- Stränge sind zunächst von unbestimmter Länge, besitzen jedoch durch die Primer definierte Ausgangspunkte, die so den zu amplifizierenden Sequenzbereich genau festlegen.

Diese neusynthetisierten DNA- Doppelstränge werden in einem zweiten Reaktionszyklus nach erneuter Denaturierung ebenfalls zu Matrizen und können mit den entsprechenden Oligonukleotiden hybridisieren. In einem sich nun anschließenden dritten Reaktionszyklus entstehen daher nur noch doppelsträngige DNA- Moleküle, die von den Primern flankiert sind. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Reaktionsfolge aus DNA- Denaturierung, Primer- Anlagerung und Auffüllreaktion wird die Zielsequenz exponentiell amplifiziert.

Die Taq- Polymerase, welche für die PCR verwendet wurde, stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Da es sich hierbei um ein thermophiles Bakterium handelt, hat dessen DNA- Polymerase ein Temperaturoptimum von 72°C und ist darüber hinaus für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil. Dies ist Voraussetzung dafür, dass alle notwendigen Reaktionsschritte ohne Zerstörung des Enzyms im gleichen Reaktionsansatz automatisiert durchgeführt werden können.

Die verwendeten Primer wurden in lyophilisierter Form von der Firma Qiagen bezogen, in sterilem Wasser aufgenommen und in einer Endkonzentration von 1 μM in der PCR eingesetzt. Zur Durchführung der PCR wurde der Thermocycler PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) der Firma MJ Research verwendet.

3.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA:

Agarosegelelektrophorese

Durch eine Agarosegelelektrophorese ist die Auftrennung von DNA- Fragmenten in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe möglich. Dabei richtet sich die jeweilige Konzentration der Agarose im Gel nach der Größe der Fragmente, die aufgetrennt werden sollen.

Die benötigte Agarosemenge wurde in dem entsprechenden Volumen 1x TAE- Puffer unter Kochen aufgelöst. Nachdem der Ansatz auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben und der Ansatz in die vorbereitete Gießapparatur gegossen.

Vor der Auftrennung wurden die Proben mit 5x Probenpuffer versetzt und in einer horizontalen Elektrophoresekammer in 1x TAE- Puffer bei einer Feldstärke von 5- 7 V/cm Gel aufgetrennt. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in DNA interkaliert, waren DNA- Fragmente nach dem Gellauf unter UV- Licht als orangefarbene Banden erkennbar. Die Gele wurden unter kurzweiligem UV- Licht betrachtet ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Zur Dokumentation wurde ein digitalisiertes System eingesetzt (MWG Biotech Gel Print 2000i), bei dem Gele mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommen werden und die Bilder anschließend auf einem Thermodrucker wiedergegeben werden können.

3.2 RNA- Techniken

3.2.1 RNA- Isolierung

Zur RNA- Isolierung wurde das RNeasy Mini- Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Aufreinigung der RNA aus Zellen erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.2.2 DNase- Verdau isolierter RNA

Um DNA- Verunreinigungen aus der isolierten RNA zu entfernen, wurde ein DNase- Verdau durchgeführt.

Die RNA wurde mit 3 µl (30 Units) RNase- freier DNase versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase inaktiviert (15 min, 70°C).

Um den Erfolg des DNase- Verdau zu kontrollieren, wurde eine Alu- PCR durchgeführt. Alu- Sequenzen sind hochrepetitive Elemente des menschlichen Genoms, die allerdings nicht transkribiert werden und somit einen "Marker" für genomische DNA darstellen.

3.2.3 Herstellung von cDNA: Reverse Transkription

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit Hilfe der Superscript III Reversen Transkriptase (Invitrogen). Es wurden jeweils 4 µg zuvor DNase- verdauter RNA in der Reaktion eingesetzt, die nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch eine 15- minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3 Proteintechniken

3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung

3.3.1.1 Zellaufschluss

Zellen, die in verschiedenen großen Platten als Monolayer- Kultur gewachsen waren, wurden einmal mit PBS- Puffer gewaschen, mit einem Zellschaber abgeschabt und abzentrifugiert (13000 rpm, 1 Minute). Das Pellet wurde sofort mit 100 µl heißem (95°C) 1x SDS- Gel Ladepuffer versetzt und leicht resuspendiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurde das so erhaltene Lysat für 10 Minuten gekocht. Um die in den Proben enthaltene chromosomale DNA zu scheren, wurde das Lysat wiederholt durch eine 23 gauge- Kanüle passagiert. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für Analysen im Western Blot verwendet, nachdem die Proteinkonzentration anhand einer photometrischen Messung bestimmt worden war.

3.3.1.2 Isolierung der High Membrane (HM) Proteinfraktion

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit Hilfe eines sterilen Zellschabers aus dem Kulturgefäß in kaltem TD- Puffer abgeschabt, durch Zentrifugation pelletiert und in kaltem Ca- RSB- Puffer wiederaufgenommen. Nach einer 10- minütigen Inkubation in diesem Puffer wurden die Zellen durch 30 Stöße in einem Dounce- Homogenisator aufgebrochen. In unmittelbarem Anschluss wurde das Homogenisat in kaltem 2,5x MS- Puffer zur Stabilisierung der Mitochondrien aufgenommen und die Probe dreimal bei 3000 rpm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, um die Zellkerne und den Zelldebris abzutrennen. Danach wurden die Mitochondrien bei maximaler Geschwindigkeit für 15 min in der Zentrifuge pelletiert, das Pellet sofort mit 60 µl heißem (95°C) 1x SDS- Gel Ladepuffer versetzt und mit Hilfe von Ultraschall ein Aufschluss der Mitochondrienmembranen vorgenommen, welcher die

Proteinausbeute erhöht. Anschließend wurde das so erhaltene Lysat für 5 Minuten gekocht.

Alternativ wurde für den Nachweis der Bak- Aktivierung das Pellet vor der Zugabe von 25 µl 2x SDS- Gel- Ladepuffer einem 20- minütigen Trypsinverdau (25 µl; Konz.: 125 µg/ml) unterzogen. Auch das so erhaltene Lysat wurde für 5 Minuten gekocht.

3.3.1.3 Isolierung der zytosolischen Proteinfraktion

Der beim letzten Zentrifugationsschritt in Kapitel 3.3.1.2 erhaltene Überstand wurde mit der doppelten Menge 100 %igem Ethanol versetzt und für eine Stunde bei -70°C gelagert. Es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 30 Minuten. Der somit erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet wiederum sofort mit 60 µl heißem (95°C) 1x SDS- Gel Ladepuffer versetzt und mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen.

3.3.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl des Proteinextraktes in 0,5 ml 0,1 M NaOH verdünnt, durchmischt und die OD_{280} im Photometer gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$6,4/\text{OD}_{280} = x \text{ µl, die } 15 \text{ µg Protein enthalten}$$

3.3.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch eine SDS- Gelelektrophorese wird eine Auftrennung der im eingesetzten Zelllysate enthaltenen Proteine in Gegenwart eines Überschusses an SDS erreicht. Das negativ geladene SDS lagert sich dabei an die hydrophoben Regionen des Proteins an. Dadurch werden fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört. Auf diese Weise wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass deren Bewegung im elektrischen Feld eine lineare Funktion zum Logarithmus

ihres Molekulargewichts darstellt. Außerdem werden die unterschiedlichen Molekülformen ausgeglichen, indem die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Auflösen von Wasserstoffbrücken und Spaltung der Moleküle zerstört werden. Schwefelbrücken, die sich zwischen Cysteinresten gebildet haben, werden durch das Erhitzen der Probe mit DTT und SDS dissoziiert.

Die Gelmatrix entsteht durch eine Kopolymerisation von Acrylamid und quervernetzendem N, N'-Methylenbisacrylamid. Mit Hilfe von Ammoniumpersulfat (APS) wird die Polymerisierungsreaktion gestartet und durch N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Dabei sind die Porengröße und damit auch die Auftrennungseigenschaften des Gels von der Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid abhängig.

Um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt, d.h. das zu analysierende Proteingemisch wurde in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei übereinander liegenden Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichem pH-Wert bestand.

Zur Auftrennung der Proteine wurden 8 – 15 %ige Polyacrylamid-Trenngele verwendet. Um das relative Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurden Markerproteine bekannter Molekulargewichte parallel zu den zu untersuchenden Proteinen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Voltzahl von 120 V bis 220 V.

Gelkomponenten	Trenngel			Sammelgel
	8 %	12 %	15 %	5 %
1M Tris pH 6,8	/	/	/	625 µl
1 M Tris pH 8,8	4,5 ml	6,0 ml	6,0 ml	/
30 % Acrylamid	3,2 ml	7,4 ml	9,0 ml	1,0 ml
2 % Bis- Acrylamid	1,28 ml	2,96 ml	3,7 ml	400 µl
10 % SDS	240 µl	320 µl	320 µl	120 µl
H₂O_{dest.}	2,72 ml	1,7 ml	/	3,7 ml
APS	50 µl	140 µl	140 µl	50 µl
TEMED	10 µl	14 µl	14 µl	10 µl

3.3.3 Western Blot (Immunoblot)

Beim Western Blot- Verfahren werden Proteine, die zuvor in einer SDS- PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Dabei bleiben sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper können anschließend die Proteine immunologisch identifiziert werden.

3.3.3.1 Proteintransfer

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte mittels einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer („LKB 2005 Transphor electro blotting unit“) für 2 Stunden bei 330 mA oder über Nacht bei 30 mA. Nach dem Blotten wurde die Spur mit den Markerproteinen abgetrennt und getrocknet. Um unspezifische Bindungen der Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine zu vermeiden, wurde die Membran zuvor für 30 Minuten in 5 %iger PBS- Milch geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Bevor die Detektion des Primärantikörpers mit Hilfe eines Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgen konnte, war ein Waschschrift von 30 min mit PBS notwendig, um nichtgebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 1,5 Stunden bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Auf diese Inkubation folgte wiederum ein Waschschrift von 30 Minuten, bevor der Antikörpernachweis durch eine Peroxidase- katalysierte chemische Reaktion erfolgen konnte.

3.3.3.2 Detektion durch Chemolumineszenz

Die Methode der Chemolumineszenz ist eine sensitive, nichtradioaktive Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen. Die Detektion der Proteine erfolgt durch eine enzymatische Lichtreaktion. Durch den Peroxidase- konjugierten Sekundärantikörper kommt es zu einer Lichtemission (428 nm), wenn H_2O_2 reduziert und Luminol oxidiert wird. Zur Detektion wurde das Renaissance Chemolumineszenz

Kit der Firma Amersham verwendet. Die Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Membran wurde für eine Minute mit einem entsprechenden Volumen Detektionsreagenz inkubiert und die Lichtemission durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert.

3.4 Zellkulturtechniken

3.4.1 Kultivierung von HCT 116- Zellen

Zur Kultivierung von HCT116 Zellen und von diesen abgeleiteten Zelllinien wurde McCoy's 5A Medium mit 10 % FKS verwendet. Stabile Zelllinien, die den retroviralen Vektor pBabe- puro trugen, wurden zusätzlich einer konstanten Selektion durch 0,25 µg/ml Puromycin ausgesetzt.

Eine Subkultivierung der HCT116 Zellen erfolgte zweimal pro Woche.

3.4.2 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY

Bei einigen Experimenten war es nötig, die Anzahl der in einer Zellsuspension enthaltenen Zellen zu bestimmen. Dies geschah mit Hilfe des "Cell counter and Analyser SYstem" (CASY) der Firma Schärfe. Bei diesem Verfahren ist es möglich, gleichzeitig Zelldichte und Größenverteilung einer Zellpopulation zu bestimmen. Passieren die Zellen eine Lichtmesszelle im Gerät, so wird die Änderung des Widerstandes in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die Widerstandsmessung wird computertechnisch mit der Signalauswertung über Pulsflächenanalyse verbunden. Dabei ist die Fläche des gemessenen Impulses proportional zum Zellvolumen, was die gleichzeitige Messung von Dichte und Größenverteilung innerhalb der untersuchten Zellpopulation ermöglicht.

Die Messung erfolgte, indem eine 1:1000- Verdünnung der zu untersuchenden Zellpopulation (6 μ l Zellsuspension + 6 ml CASYton) mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare bekannter Geometrie gesaugt wurde. Diese elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung. Da intakte Zellen Isolatoren darstellen, kommt es innerhalb der Kapillare zu einer Erhöhung des Widerstandes. Diese Widerstandsänderung ist, unter der Voraussetzung, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren, ein Maß für das Volumen der Zelle. Aus zwei Messsignalen errechnet der Computer einen Mittelwert in Form eines Integrals, das dem Zelldurchmesser proportional ist. Als Ergebnis der Messung ergibt sich ein Histogramm, bei dem die relative Zellzahl gegen den Durchmesser aufgetragen wird.

3.4.3 Transfektionseffizienz

Für die Beurteilung der Messergebnisse von verschiedenen Zell- Transfektionen ist es wichtig die Transfektionseffizienz zu untersuchen. Hierzu wählten wir die Transfektion mit dem Vektor pEGFP- C1 bzw. einer Fluoreszin (FITC)- gekoppelten siRNA und die Zählung der fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 3.4.4). Mit Hilfe der jeweiligen Transfektionsreagenzien und Protokolle (s. Kapitel 3.4.6 und 4.7) wurden die an die entsprechenden Strukturen gekoppelten Farbmoleküle in die Zellen eingebracht. Die in die Zellen aufgenommene Menge konnte bereits 5 Stunden nach der Transfektion in der FACS- Analyse ausgewertet werden. Im Falle des Plasmids erfolgte eine Anregung der Fluoreszenz mittels Argonlaser bei 480 nm, die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 507 nm gemessen. Die Anregung der FITC- Moleküle erfolgte ebenfalls bei 480 nm, das Emissionmaximum betrug 530 nm.

3.4.4 Durchflusscytometrie (FACS- Analyse)

Die Durchflusscytometrie bzw. FACS- Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht die Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Während des Messvorgangs werden die Zellen durch Unterdruck stark beschleunigt, so dass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt am Messpunkt fokussiert werden. Durch die gleichzeitige Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes kann die relative Größe und Granularität der Einzelzellen bestimmt werden. Dabei korrelieren sowohl Größe als auch Granularität direkt mit der Lichtintensität. Somit ist die Einheit der FACS- Analyse die relative Lichtintensität.

Für eine Zellzyklusanalyse wurden je $3,5 \times 10^5$ Zellen in 6- Loch- Platten bzw. $2,5 \times 10^5$ Zellen in 12- Loch- Platten bzw. 1×10^5 Zellen in 24- Loch- Platten ausgesät und je nach experimentellem Ansatz unterschiedlich lange mit verschiedenen Substanzen behandelt. Um die Zellen zu ernten wurden sie trypsinisiert und zusammen mit dem Mediumüberstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 1 min) wurden die Zellen einmal mit 500 µl PBS gewaschen, wiederum abzentrifugiert und in 200 µl 0,9 %iger NaCl- Lösung resuspendiert. Um die Zellen zu vereinzeln wurde die Zellsuspension durch eine 23 gauge Kanüle passagiert und in 1,8 ml Methanol zur Fixierung aufgenommen. Die Fixierung erfolgte für mindestens 1 Stunde bei -20°C .

Nach der Fixierung wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit 500 µl PBS gewaschen und mit 250 µl RNaseA in PBS (25 µg/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 250 µl Propidiumiodid (PI; 10 µg/ml) zugegeben, die Ansätze vermischt und für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert und diese so markiert. Durch einen Argonlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm generiert, wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Das emittierte Licht wird durch ein optisches System gemessen. Anhand eines Verteilungsdiagramms kann die Zahl der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowie die der apoptotischen Zellen ermittelt werden. Da PI in die DNA interkaliert und sich in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase auch der DNA- Gehalt in der Zelle variiert, ist eine Differenzierung der einzelnen Zellzyklusphasen sowie apoptotischer Zellen (Fragmentierung der DNA) möglich.

3.4.5 Stabile Transfektionen eukaryotischer Zellen

Durch Kotransfektion ist es möglich eine klonierte Sequenz stabil in ein Zellgenom einzuführen. Hierzu wird ein selektierbarer Marker zusammen mit dem Expressionsplasmid, welches die Sequenz enthält, die stabil exprimiert werden soll, zur Transfektion eingesetzt. Dieser Resistenzmarker kann in das eigentliche Plasmid eingebaut sein oder er kann mittels Kotransfektion eines Leervektors mit in die Zelle eingebracht werden.

In unserem Fall wurde ein Puromycinresistenz- Leervektor in die Zelle kotransfiziert. Durch selektives Wachstum in einem 1 µg/ml Puromycin- haltigen Medium, durchgeführt in einer 10 cm- Gewebekulturschale, konnten diejenigen Zellklone ausgewählt werden, die den Resistenzvektor, und somit vermutlich auch den Expressionsvektor, aufgenommen hatten. Nach dieser ersten Selektion wurden die Zellklone einer konstanten Puromycinkonzentration von 0,25 µg/ml im Medium ausgesetzt.

Bei der Lipofektionsmethode durch EFFECTENE® (Qiagen) handelt es sich um eine Transfektionsmethode mit hoher Transfektionseffizienz bei Einsatz vergleichsweise geringer DNA- Mengen. Der Vorteil dieser Methode besteht in der geringen Zytotoxizität, die das Reagenz auf die behandelten Zellen ausübt.

Die zu 100 % konfluenten Zellen der entsprechenden Monolayerkultur wurden am Vortag der transienten Transfektion in 35 mm- Platten (6- Loch- Platten) so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 50- 70 % konfluent waren.

Die einzuschleusende DNA wurde zunächst durch Interaktion mit einem „Verstärker“ (Enhancer) in einem definierten Puffersystem kondensiert und dann nach Angaben des Herstellers mit dem EFFECTENE®- Reagenz versetzt. Der Ansatz wurde nach einer Inkubation von 10 min bei RT mit Kulturmedium gemischt und auf die mit PBS gewaschenen Zellen aufgebracht.

3.4.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Im Gegensatz zur Infektion oder stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen, bei der eine Integration der DNA in das Zellgenom stattfindet, kommt es bei einer transienten

Transfektion nur zu einer vorübergehenden Einschleusung der DNA in die Wirtszellen. Die so eingeschleusten Gene sind nur vorübergehend aktiv und gehen bei weiteren Zellteilungen wieder verloren.

Die transienten Transfektionen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden im Falle der Plasmid- Transfektionen mit dem Reagenz EFFECTENE® (Qiagen) bzw. im Falle der siRNA- Transfektionen mit dem Reagenz RNAiFect® (Qiagen) vorgenommen. Der Einsatz der Reagenzien und deren Mengen richtete sich nach dem Herstellerprotokoll, jedoch mit der Einschränkung, dass das Transfektionsreagenz zu keiner Zeit maschinell, sondern lediglich durch Auf- und Abpipettieren vermischt wurde.

3.4.6.1 Transiente Transfektion mit EFFECTENE® (Qiagen)

Die zu 100 % konfluenten Zellen der entsprechenden Monolayerkultur wurden am Vortag der transienten Transfektion in 35 mm- Platten (6- Loch- Platten) so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 50- 70 % konfluent waren.

Die einzuschleusende DNA wurde zunächst durch Interaktion mit einem „Verstärker“ (Enhancer) in einem definierten Puffersystem kondensiert und dann nach Angaben des Herstellers mit dem EFFECTENE®- Reagenz versetzt. Der Ansatz wurde nach einer Inkubation von 10 min bei RT mit Kulturmedium gemischt und auf die mit PBS gewaschenen Zellen aufgebracht.

3.4.6.2 Transiente Transfektion mit RNAiFect® (Qiagen)

Das RNAiFect® Transfektions- Reagenz basiert auf einem liposomalen Transportmechanismus, durch den speziell siRNAs in Zellen eingeschleust werden können.

Am Tag vor der Transfektion wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen der entsprechenden Zelllinien auf 35 mm- Platten (6- Loch- Platten) ausgesät, was bedingte, dass sie am Tag der Transfektion zu 70- 80 % konfluent waren. Das dafür auszusäende Volumen der in 5 ml Medium aufgenommenen Zellen einer dicht bewachsenen 75 cm^2 Zellkulturflasche war vorher mittels CASY- Zellzählgerät bestimmt worden.

Eine nach Herstellerangaben entsprechende Menge an Puffer, RNAiFect® Transfektionsreagenz und siRNA wurden miteinander vermischt, und für 10- 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Tröpfchenweise wurde das Transfektionsreagenz auf die Platten aufgetragen und bis zur weiteren Verwendung darauf belassen.

4 Ergebnisse

4.1 Selektivität des Bak Antikörpers

Aufgrund der großen Anzahl verfügbarer Antikörper gegen das humane Bak- Protein war es zunächst wichtig, die beiden in der Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörper (Bak, Pharmingen und Bak (G23), Santa Cruz) auf ihre Fähigkeit, das für diese Arbeit maßgebliche humane Bak- Protein detektieren zu können, zu testen. Zu diesem Zwecke wurde das Protein in HCT116 Zellen mittels Vektortransfektion überexprimiert. Zum Einsatz kam hier das in Kapitel 2.15.3 beschriebene Plasmid mit der in Kapitel 2.16.3 beschriebenen eingefügten Sequenz.

4.1.1 Transfektionseffizienz der HCT116 Zellen für Plasmide

Vor dem eigentlichen Versuch wurde die Transfektionseffizienz der HCT116 Zellen mittels Transfektion des das grüne Fluoreszenzprotein produzierende pEGFP-C1 Plasmids überprüft.

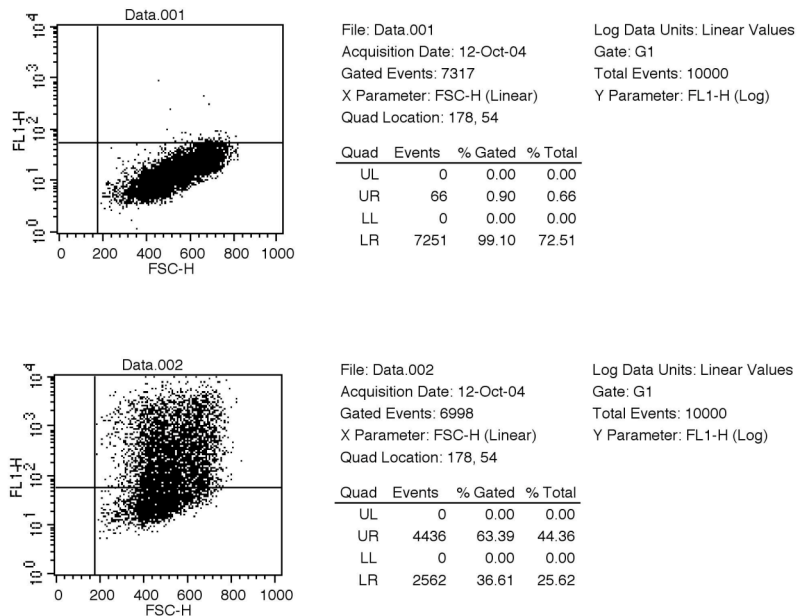


Abb. 4.1: Transfektionseffizienz der HCT116 Zellen für Plasmidtransfektionen, ausgewertet mittels FACS- Analyse. Das obere Diagramm zeigt die Fluoreszenz der kontrolltransfizierten Zellen, das untere Diagramm die der mit dem GFP- gekoppelten Plasmid transient transfizierten Kolontumorzellen. Die Punkte in dem oberen rechten Quadranten stellen diejenigen Zellen dar, die aufgrund des aufgenommenen Plasmids eine Fluoreszenz nach Anregung durch den Argonlaser aufweisen. Die Effizienz betrug in diesem Versuch 63,39 %.

Das erhaltene Ergebnis von 63,39 % Transfektionseffizienz, d.h. 63,39 % der Zellen hatten das Plasmid aufgenommen, war ausreichend, um eine Überexpression des humanen Bak- Proteins erreichen und erkennen zu können.

4.1.2 Transiente Transfektionen mit dem Expressionsvektor pEGFP-C1 mit dem Insert für das humane Bak- Protein

Die Transfektionen zur Überexpression des Bak- Proteins wurden nach 48 Stunden durch das Ernten der Zellen, aus denen anschließend Gesamtzellproteinextrakte hergestellt wurden, abgestoppt. Als Kontrolle wurden HCT116 Zellen mit dem Leervektor pEGFP-C1 transfiziert. Der Auftrennung der Proteine über die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese folgte die Durchführung einer Western Blot Analyse, in der die Membranen über Nacht mit je einem der beiden infrage kommenden

Antikörper inkubiert wurden. Es folgte die Inkubation der Membranen mit den jeweiligen POX-gekoppelten Sekundärantikörpern und die Detektion des Chemolumineszenzsignals auf einem Röntgenfilm. Daraus ergab sich folgendes Bild:

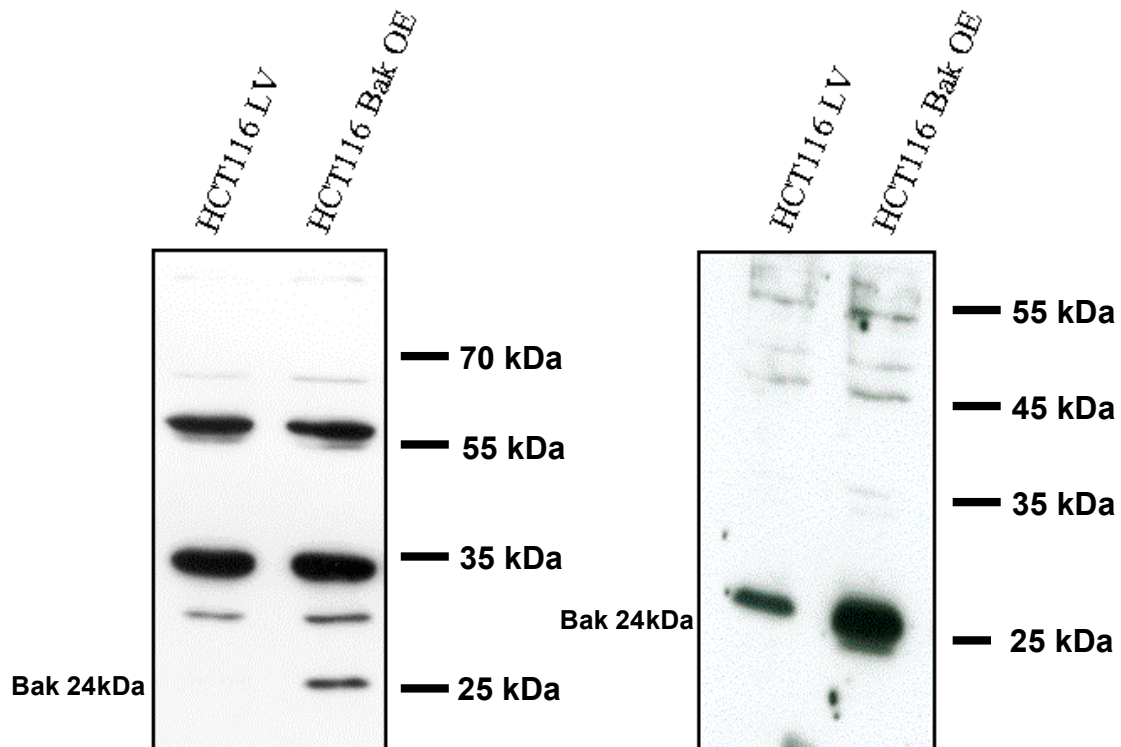


Abb. 4.2: Überexpression des humanen Bak- Proteins und dessen immunologischer Nachweis. HCT116 Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, welches als Insert die Sequenz für das humane Bak Protein enthielt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert. Mit Hilfe eines prestained Markers konnte die Bande für das ca. 24 kDa große Protein identifiziert werden. Links: Inkubation des Immunoblots mit dem Bak- Antikörper der Firma Santa Cruz. Es zeigt sich, dass das ca. 24 kDa große Bak in physiologischen Konzentrationen (linke Spur, kontrolltransfiziert) mit diesem Antikörper nicht nachweisbar ist, lediglich eine Überexpression konnte erkannt werden (rechte Spur, transfiziert mit dem Expressionsvektor). Rechts: Inkubation mit dem Bak- Antikörper der Firma Pharmingen. Hier ist sowohl die Überexpression (rechte Spur, transfiziert mit dem Expressionsvektor) als auch der physiologische Zellgehalt (linke Spur, kontrolltransfiziert) von Bak deutlich erkennbar.

Es zeigte sich, dass nur das polyklonale Anti- Bak- Serum der Firma Pharmingen das Protein auch in physiologischen Mengen in den Zellen nachweisen konnte, der Antikörper der Firma Santa Cruz war lediglich in der Lage, das ca. 24 kDa große Protein in überexprimierter Menge zu detektieren. Zusätzlich dazu wurden durch diesen Antikörper noch weitere Banden dargestellt, die entweder durch unspezifische

Antikörperbindungen zustande kamen, oder durch die Detektion von multimeren Formen von Bak.

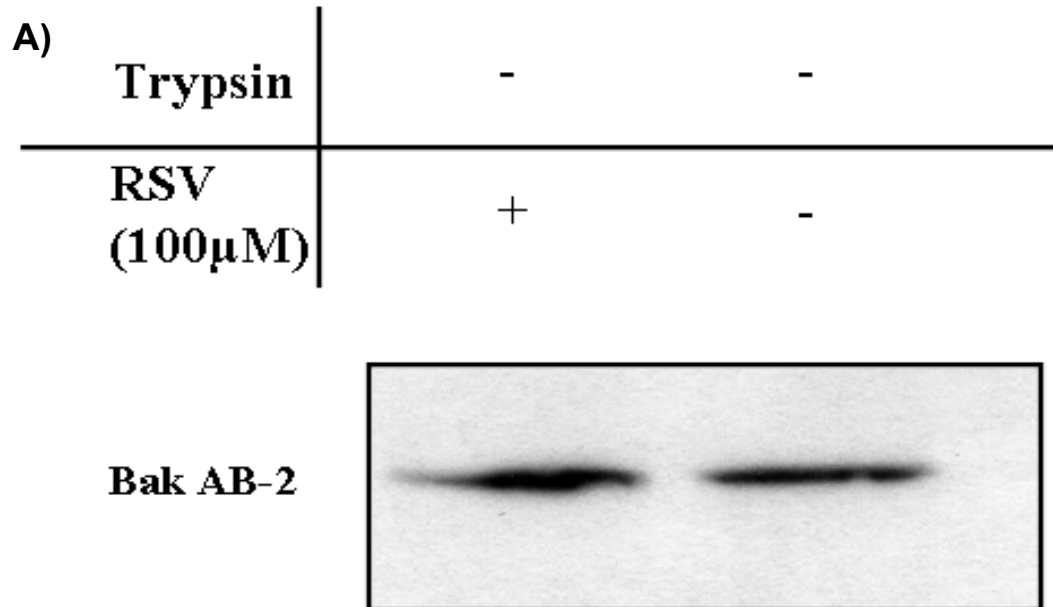
Aus dem erhaltenen Resultat ergab sich die Konsequenz, dass das polyklonale Anti-Bak- Serum der Firma Pharmingen für die weiteren Versuche als Standardantikörper verwendet wurde.

4.2 Aktivierung von Bak durch Resveratrol

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Frage war, ob das chemopräventive Phytoalexin Resveratrol in der Lage ist, Bak zu aktivieren. Von der Arbeitsgruppe Dr. Donna L. George wurde die Fähigkeit zur Bak- Aktivierung durch mitochondriales p53 mittels diverser Techniken nachgewiesen (Leu et al., 2004). Eine Methode zum Nachweis der Bak- Aktivierung beruht auf der Detektion der Konformationsänderung, die proapoptotische BCL- 2- Proteine, wie Bax und Bak, nach ihrer Aktivierung erfahren (s. Kapitel 1.3.4). Die Freilegung des N- Terminus bei Aktivierung bewirkt, dass das Protein nunmehr sensitiv gegenüber einem proteolytischen Abbau durch Trypsin wird.

Zur Untersuchung, ob auch Resveratrol zu einer Aktivierung von Bak führt, wurden in drei Ansätzen Zellen der Zelllinie HCT116 Bax-/- auf 10cm- Gewebekulturschalen ausgesät. Nachdem diese eine Konfluenz von ca. 70- 80 % erreicht hatten, wurden die Zellen für 24 Stunden mit 100 μ M Resveratrol behandelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen von den Gewebekulturschalen abgeerntet und die mitochondrialen Proteine wurden mittels differentieller Zentrifugation isoliert. Hierzu wurden die Zellorganellen dreimal für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, wobei das jeweilige Sediment aus Zellkernen und unlysierten Zellen verworfen wurde. Die im Überstand befindlichen Proteine der „High membrane“- Fraktion, zu der auch die mitochondrialen Proteine zählen, wurden durch 15- minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 13000 rpm) pelletiert. Anschliessend wurde das Pellet in 25 μ l des 2,5- fachen MS- Puffers mit oder ohne Trypsin in einer Konzentration von 125 μ g/ml resuspendiert. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde der Proteinverdau durch Zugabe von 35 μ l des 2- fachen SDS- Ladepuffers

abgestoppt. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde photometrisch bestimmt; jeweils 15 μ g der Extrakte wurden für eine Western Blot Analyse eingesetzt.



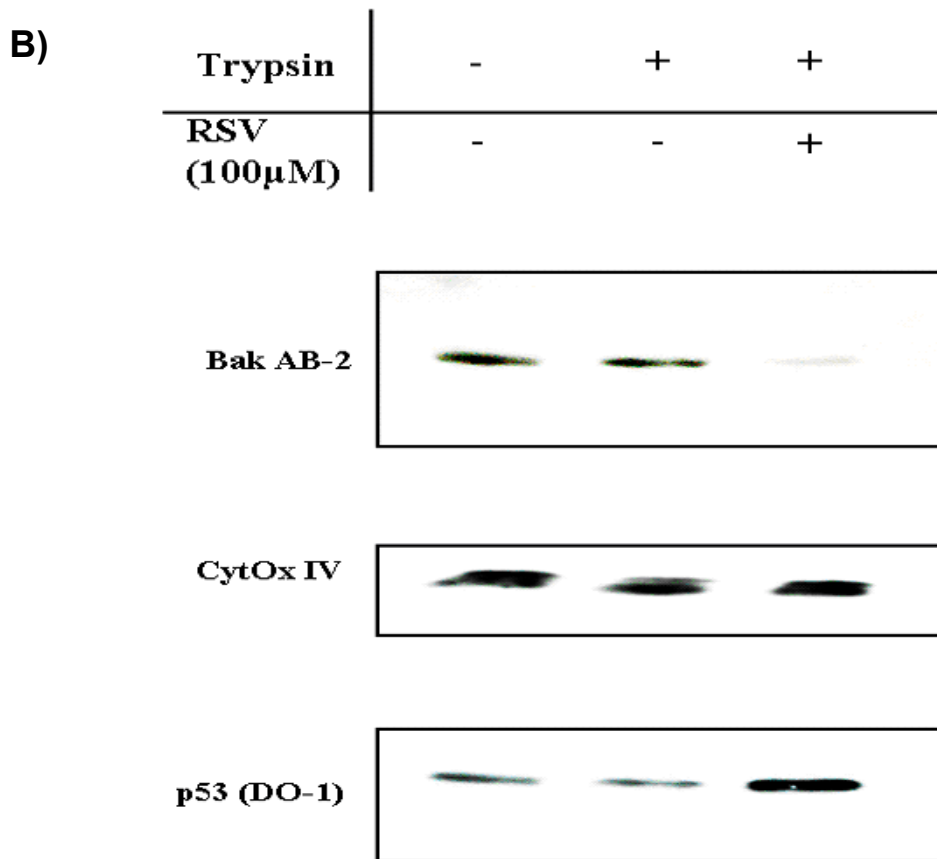


Abb. 4.3 A und B : Aktivierung von Bak durch Resveratrol. Proapoptotische BCL- 2- Proteine erfahren durch ihre Aktivierung eine Konformationsänderung am N- Terminus, was dazu führt, dass diese sensitiv gegenüber einem Trypsinverdau werden. Die pelletierten mitochondrialen Proteinfractionen aus Resveratrol- behandelten bzw. kontrollbehandelten HCT116 Bax-/- Zellen wurden mit bzw. ohne Trypsin behandelt und im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen den N- Terminus des Bak- Proteins (anti- Bak AB- 2) inkubiert. In Teil A der Abbildung wird gezeigt, dass die Menge an Bak in Resveratrol (RSV)- und kontrollbehandelten Zellen ohne Trypsinverdau keine Veränderung erfährt. Teil B: Das schwächer detektierte Signal der mit RSV und Trypsin behandelten Zellen (rechte Bande) zeigt, dass sich Bak in diesen Zellen tatsächlich als empfindlicher gegenüber einem Trypsinverdau erweist. Als Kontrolle gleicher eingesetzter mitochondrialer Proteinmengen wurde der Gehalt an Cytochromoxidase IV, einem rein mitochondrialen Protein, bestimmt. Der unterschiedliche Gehalt an p53 erklärt sich aus der Erkenntnis, dass auch p53, ähnlich wie Bax, nach Aktivierung durch RSV an die äußere Mitochondrienmembran transloziert wird (Sansome et al., 2001).

Nach Resveratrolbehandlung konnte in der Tat eine erhöhte Sensitivität des Bak Proteins gegenüber dem Trypsinverdau nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich, dass nach einer Behandlung mit Resveratrol erhöhte Mengen des Tumorsuppressorproteins p53 in der mitochondrialen Proteinfraction nachgewiesen werden können. Dies wurde durch eine Arbeit unterstützt, in welcher gezeigt werden konnte, dass p53 nach Aktivierung eine Translokation zu den Mitochondrien erfährt (Sansome et al., 2001).

4.3 Abhängigkeit der Aktivierung von Bak vom Tumorsuppressor p53

Es war bekannt, dass p53 durch Beeinflussung der Transkription, aber auch transkriptionsunabhängig auf die proapoptotischen Proteine Bax und Bak einwirken kann (s. Kapitel 1.3.5).

In einem vorangegangenen Projekt unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine durch die Aktivierung von Bax hervorgerufene Apoptose sowohl in Abhängigkeit als auch unabhängig vom Tumorsuppressorprotein p53 erfolgen kann. Um den Effekt von p53 auf die Bak- abhängige Apoptose zu untersuchen, wurde der Versuch aus Kapitel 4.2 wiederholt, allerdings mit der Zelllinie HCT116 p53^{-/-}, in welcher das p53- Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden war (Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, USA).

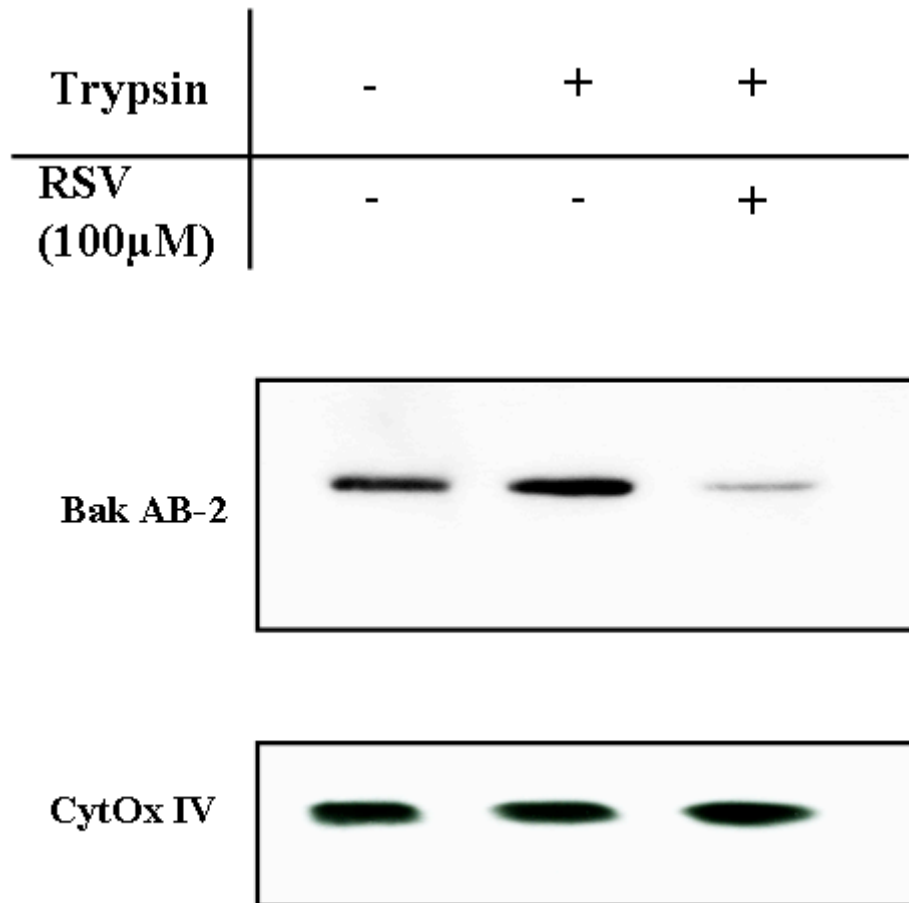


Abb. 4.4 : Abhängigkeit der Aktivierung von Bak vom Tumorsuppressor p53. Wiederholung des Versuchs aus Kapitel 4.2, jedoch an HCT116 p53^{-/-} Zellen. Auch ohne das Wirken von p53 ist in den mit Resveratrol behandelten Zellen nach Trypsinverdau ein verminderter Gehalt an Bak zu erkennen. Dies ist auf die durch die Freilegung des N- Terminus erlangte Sensitivität des Proteins gegenüber der proteolytischen Spaltung mit Trypsin zurückzuführen. Der zur Kontrolle aufgetragene Nachweis von Cytochromoxidase IV zeigt, dass gleiche Mengen des Proteins eingesetzt worden waren.

Es zeigte sich, dass die Aktivierung des Bak- Proteins durch Resveratrol in HCT116- Zellen unabhängig vom p53- Tumorsuppressor erfolgen kann (s. Abb. 4.4).

4.4 Auswirkungen der Bak- Aktivierung

Wie in Kapitel 1.2.3.2.2 über die mitochondriale Apoptose und in 1.2.3.3 über die Regulation des mitochondrialen Apoptosesignals beschrieben, resultiert eine Aktivierung der proapoptotischen BCL- 2- Proteine in der Oligomerisierung dieser Proteine. Dies wiederum führt zur Bildung einer Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, durch welche Substanzen, die im Intermembranraum der Mitochondrien sequestriert werden, in das Zytoplasma entlassen werden. Dort üben diese Substanzen die Wirkung von Todeseffektoren aus. Bezüglich des Proteins Bax konnte nachgewiesen werden, dass dessen Oligomerisierung zu einer Freisetzung von Cytochrom c führt, welches die Caspasen- Kaskade auslöste (Jurgensmeier et al, 1998).

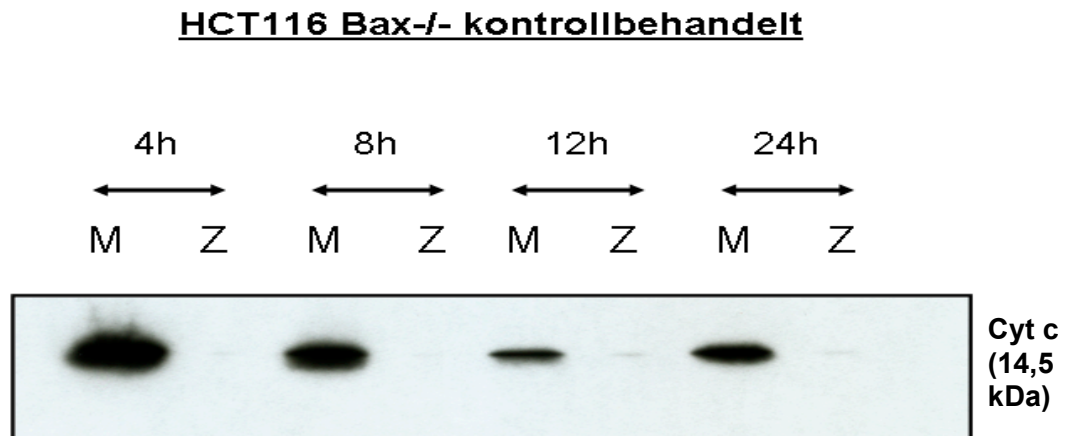
Da wir dies auch für das Protein Bak untersuchen wollten, verwendeten wir für die folgenden Untersuchungen HCT116 Bax-/- Zellen, um einen Effekt von Bax auf die Freisetzung von Cytochrom c ausschliessen zu können.

4.4.1 Cytochrom c Freisetzung nach Bak- Aktivierung

Für diesen Versuch wurden acht Ansätze der HCT116 Bax-/- Zellen auf je vier 10 cm- Gewebekulturschalen ausgesät, welche nach Erreichen von 70- 80 % Konfluenz jeweils kontrollbehandelt (DMSO) bzw. mit 100 µM Resveratrol behandelt wurden. Die Reaktion des ersten Ansatzes wurde nach 4 Stunden angehalten, die des zweiten Ansatzes nach 8 Stunden, die des dritten nach 12 Stunden und die des vierten nach 24 Stunden. Der Überstand aus den jeweils gewonnenen Organellsuspensionen, welche durch dreimalige Zentrifugation bei 3000 rpm für je 5 Minuten entstanden war, wurde durch 15- minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in die nun pelletierte mitochondriale Fraktion und die wiederum im Überstand befindliche zytoplasmatische Proteinfraction aufgespalten. Aus Letzterer konnten die Proteine durch Fällung mit 100 % igem Ethanol für eine Stunde bei -70° C gewonnen werden.

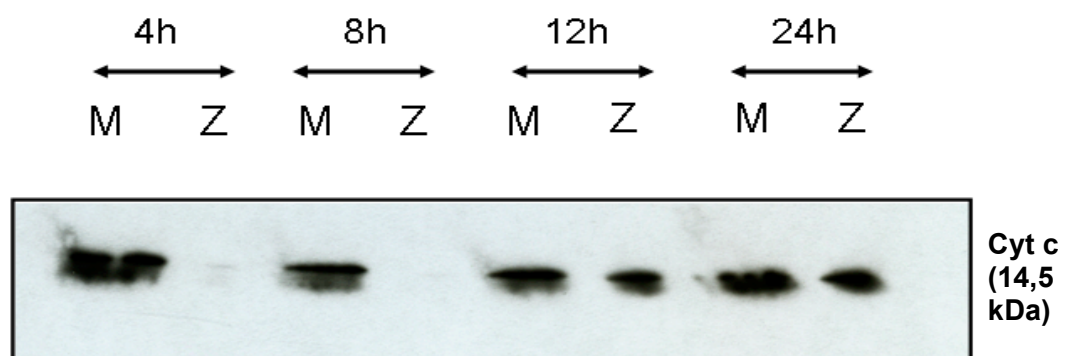
Die Pellets beider Fraktionen wurden in 60 µl des 95° C heißen 2- fach SDS- Ladepuffers resuspendiert und für 5 Minuten bei 95° C gekocht. Nach Bestimmung

der Proteinkonzentrationen wurde mit den somit entstandenen 16 Proteinextrakten ein Immunoblot durchgeführt, welcher mit dem Cytochrom c Antikörper (BD Biosciences) inkubiert wurde.



M= mitochondriale Proteine Z= zytoplasmatische Proteine

HCT116 Bax^{-/-} behandelt mit 100 μ M Resveratrol



M= mitochondriale Proteine Z= zytoplasmatische Proteine

Abb. 4.5 : Cytochrom c Freisetzung nach Bak- Aktivierung. Die Auftrennung der mitochondrialen und der zytoplasmatischen Proteinfractionen aus Resveratrol- bzw. kontrollbehandelten HCT116 Bax^{-/-} Zellen erfolgte nach der angegebenen Zeit per Zentrifugation und im Falle der Zytoplasmafraktion durch zusätzliche Fällung mit Ethanol. Der ausgeführte Immunoblot wurde mit einem Antikörper gegen Cytochrom c inkubiert. Im oberen Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass Cytochrom c fast ausschliesslich in der mitochondrialen Proteinfraction vorlag und fast nicht im Zytoplasma von kontrollbehandelten Zellen vorzufinden war. Hingegen konnte im unteren Blot, welcher das Ergebnis der Resveratrol- behandelten Zellen darlegt, nach 12 und 24 Stunden eine Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma detektiert werden.

Bereits nach 12 Stunden war in den Resveratrol- behandelten Zellen ein Anstieg der Cytochrom c- Menge im Zytoplasma zu erkennen, der auch nach 24 Stunden noch anhielt, während in den kontrollbehandelten Zellen auch nach diesen Zeiten fast kein Cytochrom c Gehalt im Zytoplasma nachweisbar war.

4.4.2 Caspase- 9- Aktivierung durch Cytochrom c

Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranspalt führt in den meisten Fällen zu einer Aktivierung der Caspasen- Kaskade. Innerhalb des durch mitochondriale Apoptosesignale ausgelösten Caspase- Wegs kommt es zunächst zu einer Anregung der Initiatorcaspase- 9, und daraus resultierend zu einer Aktivierung der Effektorcaspase- 3 (s. Kapitel 1.2.3.2.3).

Zur Untersuchung, ob dies der dem Cytochrom c nachgeschaltete Weg der Bak-vermittelten, Resveratrol- induzierten Apoptose ist, wurden die zytosolischen Proteinextrakte aus Versuch 4.4.1 in einem weiteren Immunoblot eingesetzt. Die dadurch erhaltene Immobilon- Membran wurde mit einem gegen die aktivierte Caspase- 9 gerichteten Antikörper inkubiert, so dass nach Behandlung mit dem Sekundärantikörper eine Aussage über die Veränderung des Gehaltes an aktiver Caspase- 9 getroffen werden konnte.

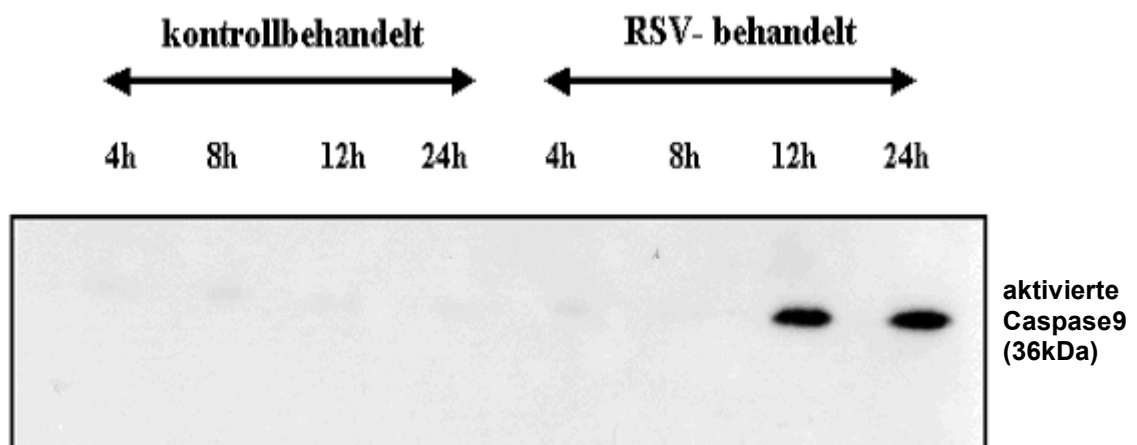


Abb. 4.6 : Caspase- 9 Aktivierung nach Resveratrolbehandlung. Nach einem erneuten Immunoblot der zytosolischen Proteine aus Kapitel 4.4.1 sollte mit Hilfe eines gegen die aktive Form der Caspase- 9 gerichteten Antikörpers die Aktivierung der Caspasen- Kaskade durch die Cytochrom c Freisetzung nachgewiesen werden. Auch im Falle der Initiatorcaspase- 9 ist nach 12 bzw. nach 24 Stunden eine erhöhte Menge des Proteins im Zytosol nachweisbar.

Nach 12 und 24 Stunden war auch in diesem Fall eine deutliche Steigerung der Menge an aktiver Caspase- 9 im Zytosol nachweisbar.

4.4.3 Aktivierung der Effektorcaspase- 3

Der Rekrutierung einer Initiatorcaspase sollte im Normalfall eine Aktivierung der entsprechenden Effektorcaspase folgen. Als hauptsächliche Effektorcaspase einer Bax- abhängigen mitochondrialen Apoptose erwies sich die Caspase- 3 (Mahyar-Roemer et al., 2002). Um dies auf das Bak- Protein bezogen zu überprüfen wurde die in Kapitel 4.4.2 benutzte Membran mit einem gegen die Caspase- 3 gerichteten Antikörper inkubiert. Es zeigte sich, dass auch nach 24 Stunden noch keinerlei Aktivierung von Caspase- 3 zu beobachten war.

4.4.4 Freisetzung von Apoptosis Inducing Factor (AIF)

Zwar implizierten die erlangten Kenntnisse das Vorliegen eines Caspase-abhängigen Zelltodes, wir wollten aber weitergehend untersuchen, ob die Freisetzung weiterer Todeseffektoren, wie der Apoptosis- Inducing Factor AIF (s. Kapitel 1.2.3.2.4) oder die Serinprotease HtrA2/Omi (s. Kapitel 1.2.3.2.5) nachweisbar wäre. Der Verdacht wurde dadurch gestützt, dass Zellen, die aus einem soliden Tumor kultiviert worden waren, nach Behandlung mit Arsenitoxid (As_2O_3) neben einer Cytochrom c Freisetzung auch einen detektierbaren Anstieg an AIF im Zytosol aufwiesen (Kang et al., 2004).

Der Mechanismus der Freisetzung des Flavoproteins AIF aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien ist noch nicht aufgeklärt. Man weiß jedoch, dass es nach der Freisetzung aus den Mitochondrien zum Nukleus hin transloziert wird und dort eine DNA- Fragmentation bewirkt, d.h. es besitzt eine Endonukleasenaktivität, die nicht auf Caspasen angewiesen ist (Kang et al., 2004). Neben den Arbeiten, die der Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien einen Caspase- abhängigen nachgeschalteten Apoptosesignalweg zuordnen (Arnoult et al., 2003), existieren auch Meinungen, welche eine durch AIF hervorgerufene

Apoptose unabhängig vom Cytochrom c- und Caspase- 9- Signalweg propagieren (Diaz et al., 2003).

Zum Nachweis der Entlassung von AIF in das Zytosol wurden die Membranen, die dem Versuch aus Kapitel 4.4.2 entstammten, mit dem Antikörper gegen AIF inkubiert.

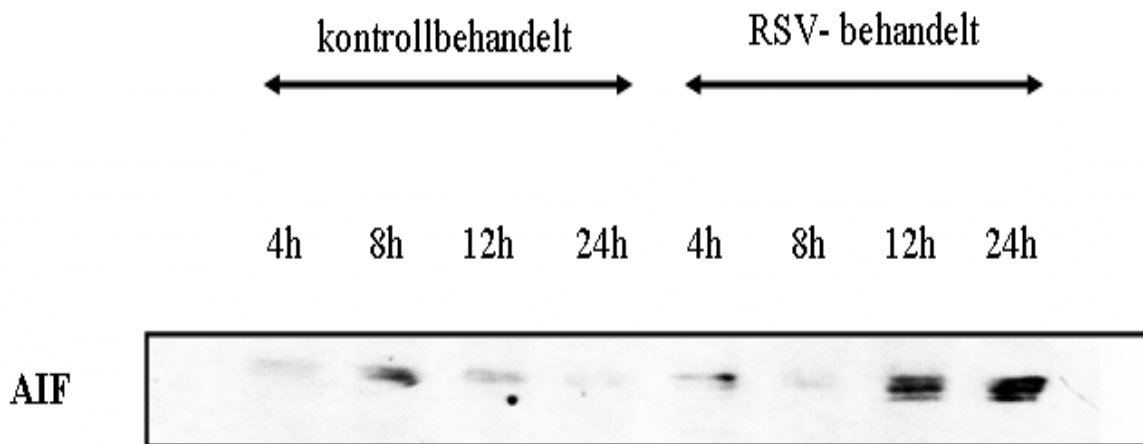


Abb. 4.7 : AIF- Freisetzung nach Resveratrolbehandlung. Die Membran aus dem vorangegangenen Versuch wurde mit dem AIF Antikörper inkubiert. Ein deutlicher Anstieg des Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der RSV- behandelten Zellen im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen konnte nach 12 und 24 Stunden beobachtet werden. Auffällig ist weiterhin, dass auch in kontrollbehandelten Zellen AIF im Zytoplasma vorhanden sein kann, wenn auch in deutlich geringerer Menge.

Eine deutliche Zunahme an AIF in der zytosolischen Proteinfraction war nach 12 und 24 Stunden festzustellen, parallel zu der Erhöhung der Menge an Cytochrom c und aktivierter Caspase- 9. Weiterhin war auffällig, dass auch kontrollbehandelte Zellen einen geringen Gehalt an AIF im Zytoplasma aufweisen können.

4.4.5 Freisetzung von HtrA2/Omi

Neben den o.g. Apoptosesignalvermittlern Cytochrom c und AIF kann eine Aktivierung der mitochondrialen Apoptose durch proapoptotische BCL- 2- Proteine auch eine Freisetzung des Proteins HtrA2/Omi zur Folge haben (Arnoult et al., 2003).

Nach dem Entlassen von HtrA2/Omi aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien kann dieses die Apoptose zum einen dadurch auslösen, dass es Apoptose-inhibierende Proteine (IAPs) behindert, was in einer Aktivierung der Caspasen resultiert. Zum anderen besitzt es aber selbst auch eine Serinprotease- Aktivität, die zum Tod der Zelle beitragen kann (Hegde et al., 2002).

Ob auch HtrA2/Omi durch eine Resveratrolbehandlung in das Zytosol entlassen wird, war Gegenstand unseres nächsten Versuchs, in dem die zytosolischen Proteinextrakte aus Kapitel 4.4.1 in einem erneuten Immunoblot wieder zum Einsatz kamen.

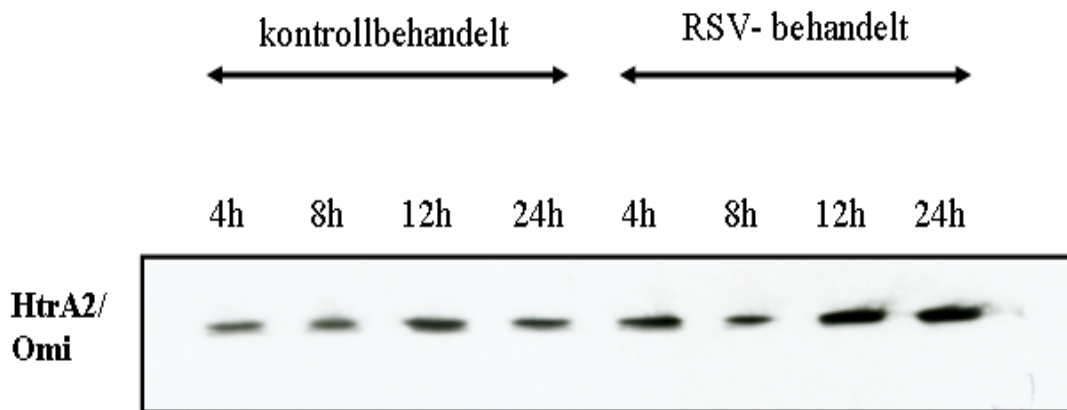


Abb. 4.8 : Freisetzung von HtrA2/Omi nach Resveratrolbehandlung. Analog zu Cytochrom c, aktiver Caspase- 9 und AIF konnte auch eine Zunahme an HtrA2/Omi 12 bzw. 24 Stunden nach einer Behandlung der HCT116 Bax^{-/-} Zellen mit 100 µM Resveratrol festgestellt werden.

Ähnlich wie in den vorangegangenen Versuchen konnten wir auch im Falle der Serinprotease HtrA2/Omi eine Zunahme nach 12 bzw. 24 Stunden Resveratrolbehandlung in HCT116 Bax^{-/-} Zellen beschreiben. Es fällt jedoch auf, dass diese Zunahme in Relation zu kontrollbehandelten Zellen geringer ausfällt als im Falle der anderen Todeseffektoren. HtrA2/Omi ist also auch unter physiologischen Bedingungen in nicht geringer Menge im Zytoplasma von HCT116- Zellen vorhanden.

Insgesamt haben diese Untersuchungen demnach gezeigt, dass Resveratrol selbst in Bax- defizienten Zellen einen mitochondrialen Zelltod zu induzieren vermag, der mit der Aktivierung des Bak- Proteins, der Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem mitochondrialen Intermembranraum und der Aktivierung der

Caspase- 9 assoziiert war. Es stellte sich folglich die Frage, ob die Aktivierung von Bak in Abwesenheit von Bax für die Resveratrol- induzierte Apoptose von Kolontumorzellen essentiell ist.

4.5 Ausschalten des Bak Gens

Um die Bedeutung von Bak für die Resveratrol- induzierte Apoptose zu untersuchen, musste versucht werden, in den HCT116- und den HCT116 Bax-/- Zellen die Menge an proapoptotischem Bak signifikant zu reduzieren. Da es bis dato keine Zelllinie gab, in der das bak- Gen (zusätzlich zum bax- Gen) durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden war, wollten wir versuchen, mit Hilfe von neuen Interferenztechniken eine Repression des Proteins zu erreichen.

4.5.1 RNA- Interferenz

Eine der Möglichkeiten, eine Stilllegung von Genen zu erreichen, besteht in der RNA- Interferenz. Diese ist vor einiger Zeit als eine der ältesten Abwehrmechanismen der Zelle *in vivo* gegen virale Infektionen erkannt worden (Fire et al., 1998). Die virale Entwicklung wird durch die posttranskriptionelle Gen- Ausschaltung gehemmt, ein Vorgang, der in Abbildung 4.8 („*in vivo*- Pfad“) erläutert ist. Die Zelle ist in der Lage, einen aus über 200 Nukleotiden bestehenden, Virusgen- spezifischen RNA- Doppelstrang durch das Einwirken eines RNase III ähnlichen Enzymes namens Dicer in ca. 19- 21 Nukleotide lange „small interfering“ RNA- Stücke (siRNA) zu spalten. Diese binden an den sogenannten „RNA- Induced Silencing Complex“ (RISC), welcher eine Endoribonuklease- Aktivität aufweist. Der RISC wird daraufhin aktiviert und das siRNA Duplex wird entwunden, wobei nur noch der antisense Strang mit dem RISC verbunden bleibt. Diese Kombination aus aktiviertem RISC und antisense- Strang der siRNA besitzt die Fähigkeit, einen entsprechend komplementären mRNA- Strang zu binden. Diese gebundene mRNA kann dann ebenfalls gespalten werden, was zum posttranskriptionellen Ausschalten des Genes durch RNA- Abbau führt (Firmeninformation Santa Cruz).

Der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Tuschl gelang es 1999, eine RNA- Interferenz mittels synthetisch hergestellter, 19- 21 bp großen siRNAs *in vitro* zu reproduzieren (Elbashir et al., 2001). Der von diesen Molekülen beschriebene Weg der Expressionsmodifikation ist ebenfalls in Abbildung 4.8 beschrieben („*in vitro* Pfad“). Die Entdeckung und die Fähigkeit zur Herstellung der kurzen Doppelstrang RNA- Stücke war deshalb von Bedeutung, da sich das zuvor erprobte Einbringen langer Stücke genspezifischer Doppelstrang- RNA, welche normalerweise den Ausgangspunkt für eine physiologische RNA- Interferenz darstellen, wegen der Aktivierung des Interferon- pathways als stark zytotoxisch erwies (Hunter et al., 1975).

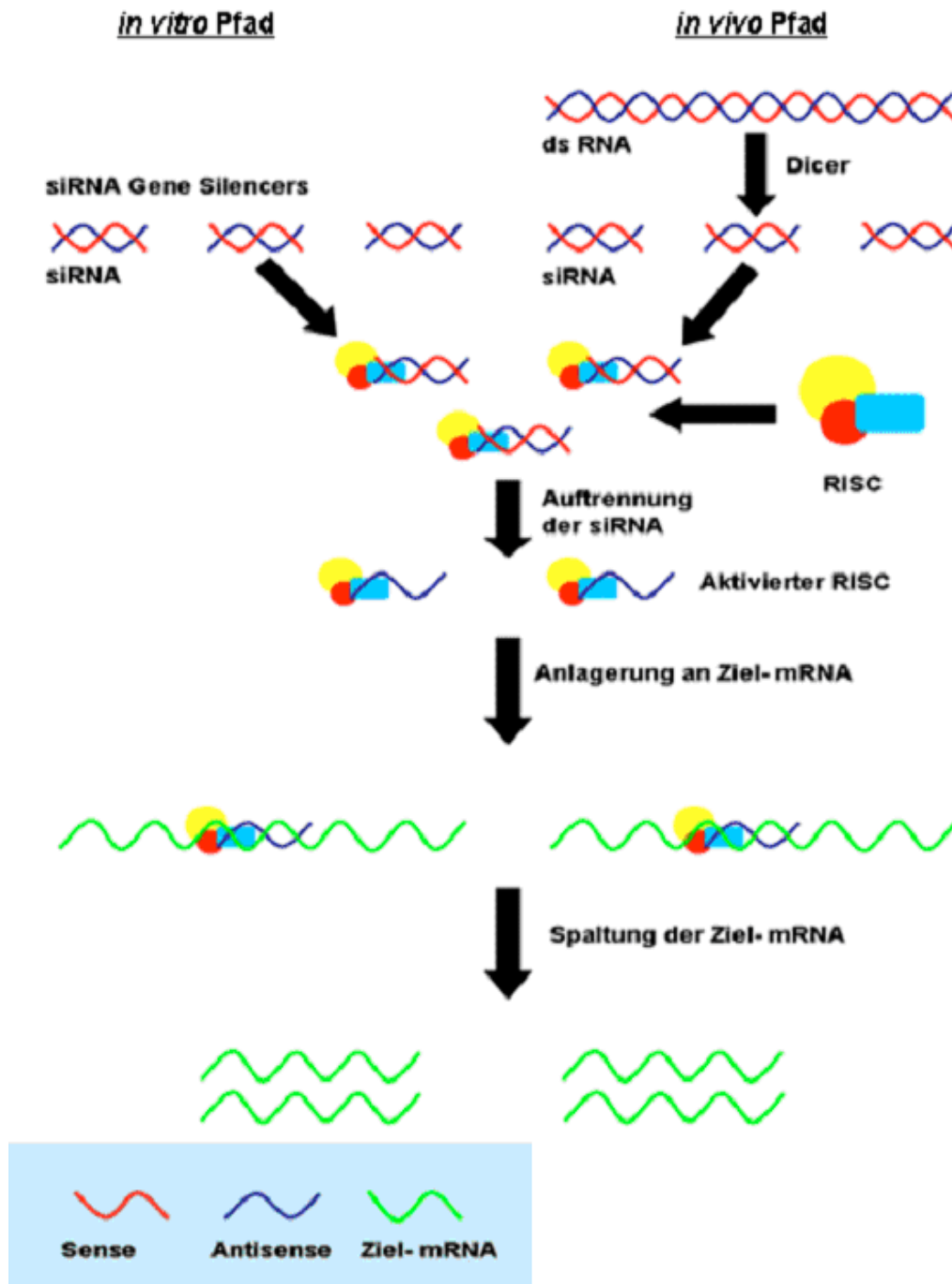


Abb. 4.9 : Funktionsprinzip der RNA- Interferenz. Rechts: *in vivo* Pfad. Lange Doppelstrang RNAs (>200 Nukleotide) werden durch das Enzym Dicer, einem RNase III- ähnlichen Enzym in 19-21 Nukleotide kurze „small interfering“ RNAs (siRNA) gespalten. Links: Alternativ dazu können diese Stücke auch als synthetisch hergestellte siRNAs von außen in die Zelle eingebracht werden oder mittels pSUPER- Vektor in der Zelle hergestellt werden. Die natürlichen oder synthetischen siRNAs verbinden sich mit einem Endoribonuklease- Komplex namens RISC (RNA- Induced Silencing Complex). Dieser wird darauf hin aktiviert und die Doppelstrang RNA wird entwunden, wobei nur noch der antisense Strang mit dem RISC verbunden bleibt. Das so entstandene Konstrukt verbindet sich mit der dem antisense Strang komplementären mRNA, welche durch die Endoribonuklease- Aktivität des RISC degradiert wird. Dies führt letztlich zum posttranskriptionellen Ausschalten des entsprechenden Gens.

Der Einsatz der siRNA hat jedoch den bedeutenden Nachteil, dass alle erzielten Effekte nur transient, das heißt von kurzer Dauer sind. Möchte man jedoch die längerfristige Repression eines Gens mittels RNA-Interferenz- Technik erreichen, so besteht seit 2002 die Möglichkeit der Kotransfektion mit dem Expressionsvektor pSUPER. Dieser von Thijn R. Brummelkamp entworfene Vektor exprimiert siRNA- ähnliche Transkripte (Brummelkamp et al., 2002). Diese 19 bp Strukturen resultieren aus dem Einbau einer Sequenz, die hauptsächlich aus der 19 Nukleotid- Sequenz des Zieltranskriptes in Vorwärtsorientierung und der entsprechenden 19 Nukleotid- Sequenz in Rückwärtsorientierung besteht. Beide Elemente werden durch eine kurze Sequenz verbunden, die nach der Transkription durch die Ausbildung eines aus 9 Nukleotiden bestehenden Loops zu einer Aneinanderlagerung der beiden 19 Nukleotid- Stränge führt. Das Prinzip des pSUPER Vektors ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Transkripte werden in der Zelle wie die durch Dicer (s. Abb. 4.8) entstandenen siRNAs prozessiert.

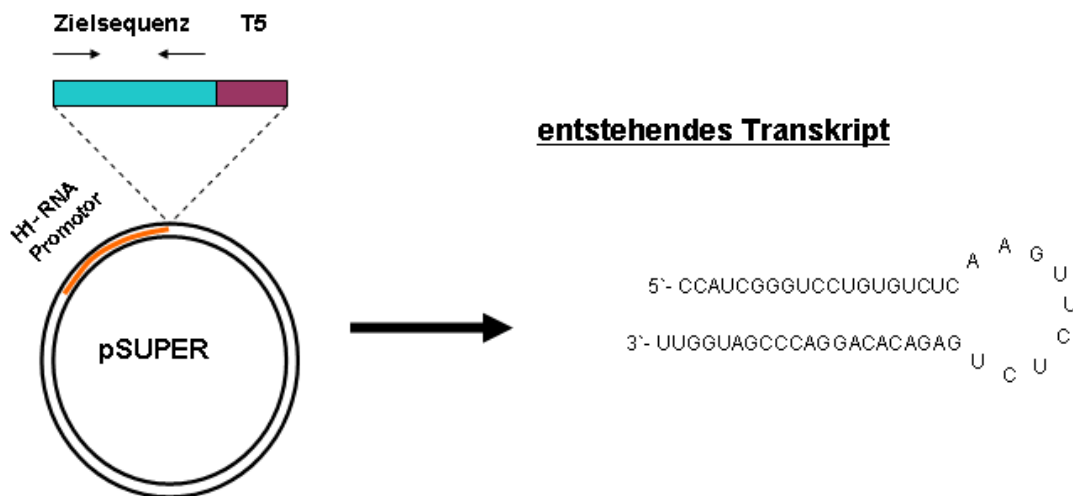


Abb. 4.10 : Funktionsprinzip des pSUPER Vektors. Das entstehende Transkript beinhaltet 19 Nukleotide der Zielsequenz in Vorwärtsrichtung, 19 Nukleotide in Rückwärtsrichtung und eine Hairpinstruktur aus 9 Nukleotiden, die zur Anlagerung der beiden komplementären RNA Stränge zu einer doppelsträngigen siRNA führt. Die beiden UU- Überhänge am 3' Ende entsprechen dem Überhang der synthetischen siRNAs.

4.6 Versuch zur Herstellung stabiler Zelllinien

Da für unsere Experimente eine längerfristige Ausschaltung des bak Gens wünschenswert gewesen wäre, wählten wir zunächst die Variante der Transfektion des pSUPER Vektors. Dieser wurde zum Zwecke des selektiven Wachstums mit dem Resistenzvektor pBabe- puro, der für eine Resistenz gegenüber Puromycin kodiert, kotransfiziert.

4.6.1 Einbau der Bak- Sequenz

Die einzusetzende 19- Nukleotid- Sequenz des bak- Genes wurde nach der Anzahl der Guanin (G)- und Cytosin (C)- Nukleotide ausgewählt. Der Gehalt an GC soll nach Angaben der Arbeitsgruppe Reuven Agami (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) mindestens 30 % betragen; außerdem dürfen weder vier Adenine, noch vier Thyminde hintereinander vorkommen, da dies eine vorzeitige Beendigung des Lesevorgangs zur Folge hätte.

Nach dem von der oben genannten Arbeitsgruppe erhaltenen Ligationsprotokoll wurde die ausgewählte Sequenz in den Vektor eingebaut. Der korrekt erfolgte Einbau des Inserts wurde anhand eines Ligationsverdau überprüft.

4.6.2 Ligationsverdau

Mittels eines EcoRI- HindIII Verdau wurde überprüft, ob ein Einbau der Sequenz in den pSUPER Vektor erfolgt war. Im positiven Fall sollte in der Agarosegelelektrophorese ein ca. 360 bp großes Insert zu erkennen sein. Der Leervektor hingegen zeigt ein ca. 300 bp großes Insert.

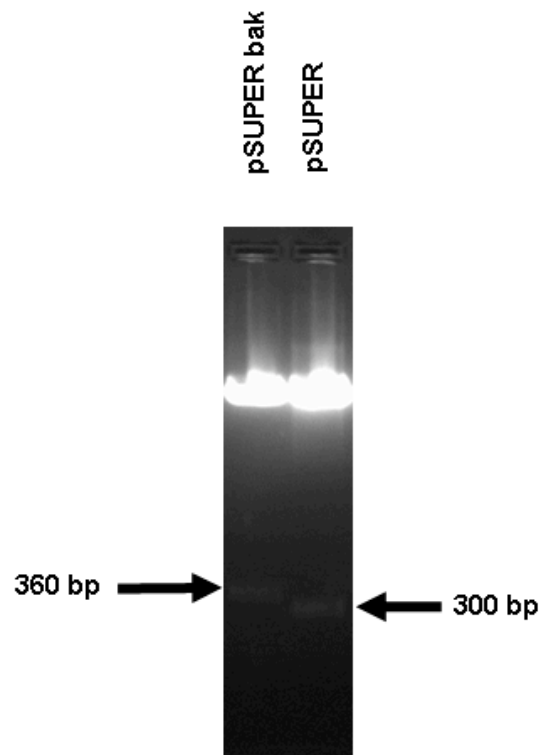
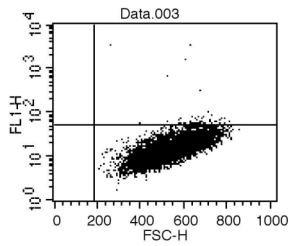


Abb. 4.11 : Ligationsverdau pSUPER bak und pSUPER. Der auf der linken Bahn aufgetragene Verdau des pSUPER bak- Vektors zeigt ein Insert der Größe ca. 360 bp. Der auf der rechten Bahn aufgetragene Verdau des Leervektors pSUPER hingegen ein 300 bp Insert. Die Digestion erfolgte mittels EcoRI- HindIII.

Der Verdau bewies, dass der Einbau der Sequenz in den pSUPER Vektor erfolgt war. Somit konnte eine Transfektion der Zelllinien HCT116 und HCT116 Bax-/- erfolgen.

4.6.3 Transfektionseffizienzen der eingesetzten Zelllinien

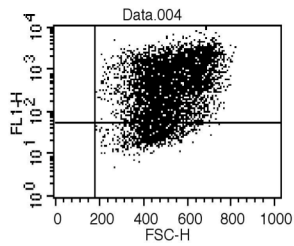
Vor den eigentlichen Transfektionen wurde die Transfizierbarkeit der Zellen mittels fluoreszenzgekoppelter Vektortransfektion (pEGFP-C1) wie in Kapitel 4.1.1 überprüft. Das Einbringen der Plasmide erfolgte mit Hilfe von EFFECTENE®, die Auswertung mittels Durchflußzytometrie.



File: Data.003
 Acquisition Date: 12-Oct-04
 Gated Events: 8050
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 178, 54

Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	57	0.71	0.57
LL	0	0.00	0.00
LR	7993	99.29	79.93

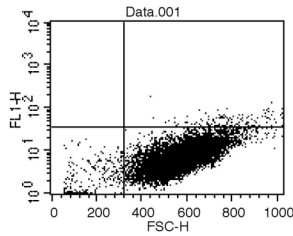


File: Data.004
 Acquisition Date: 12-Oct-04
 Gated Events: 6245
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 178, 54

Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	5306	84.96	53.06
LL	0	0.00	0.00
LR	939	15.04	9.39

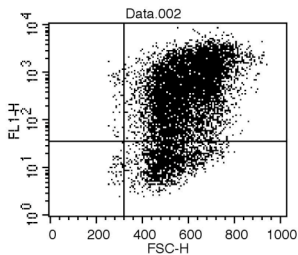
Abb. 4.12 : Transfektionseffizienz von HCT116 Bax-/-. Nach Transfektion des fluoreszenzgekoppelten Plasmids pEGFP- C1 wurde in der FACS Analyse eine Transfizierbarkeit der HCT116 Bax-/- Zellen von ca. 65 % gemessen.



File: Data.001
 Acquisition Date: 22-Oct-04
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 320, 37

Log Data Units: Linear Values
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	121	1.21	1.21
LL	279	2.79	2.79
LR	9600	96.00	96.00



File: Data.002
 Acquisition Date: 22-Oct-04
 Gated Events: 9184
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 320, 37

Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	46	0.50	0.46
UR	7333	79.85	73.33
LL	46	0.50	0.46
LR	1759	19.15	17.59

Abb. 4.13 : Transfektionseffizienz von HCT116 Zellen. Die nach Transfektion des fluoreszenzgekoppelten Plasmids pEGFP- C1 gemessene Transfektionseffizienz lag in der FACS Analyse bei 79,85 %.

Die gemessenen Effizienzen von ca. 65 % für HCT116 Bax^{-/-} und ca. 80 % für HCT116 Zellen waren ausreichend, um die Transfektionen mit dem Expressionsvektor pSUPER und dem Resistenzvektor pBabe- puro vorzunehmen. Auch diese Transfektionen erfolgten mit EFFECTENE® in 6- Loch- Platten. Die erforderliche Menge an DNA bestand zu je gleichen Teilen aus pSUPER bak und pBabe- puro. Für eine Kontrolltransfektion wurde der pSUPER Leervektor und pBabe- puro eingesetzt. 48 Stunden nach den Transfektionen wurden die Zellen durch einen Trypsinverdau von ihrer Unterlage abgelöst. Es erfolgte ein selektives Wachstum in 24- Loch- Gewebekulturplatten. Nachdem die Kolonien dicht gewachsen waren, wurden sie in 25 cm² Kulturflaschen umgesetzt. Das in den Platten und Flaschen befindliche Mc Coy's Medium enthielt neben den üblichen 10% FKS auch 1 µg/ml Puromycin (Brummelkamp et al., 2002). Dies bewirkte, dass nur diejenigen Zellen wachsen konnten, die den Resistenzvektor für Puromycin aufgenommen hatten. War dies geschehen, so war davon auszugehen, dass auch der pSUPER Vektor aufgenommen worden war. Um die Zellen einer konstanten Selektion zu unterziehen, wurde auch beim weiteren Umsetzen der Zellen auf 75 cm² Kulturflaschen nicht auf den Zusatz von Puromycin verzichtet, allerdings in einer verringerten Konzentration von 0,25 µg/ml.

4.6.4 Bak Gehalt der stabilen Klone im Western Blot

Gleichzeitig mit dem Umsetzen der Zellklone erfolgte eine Aussat auf 10 cm Gewebekulturschalen, um die Zellen auf ihren Gehalt an Bak zu testen. Dieser Test sollte zunächst auf Proteinebene mittels Western Blot- Analyse durchgeführt werden. Dabei wurden 15 µg Protein eingesetzt. Die Gleichheit der Proteinmengen wurde anhand einer Beta- Aktin Kontrolle überprüft.

Von der Selektion der einzelnen Zellklone bis zur Extraktion der Proteine vergingen im Schnitt 8 bis 10 Tage.

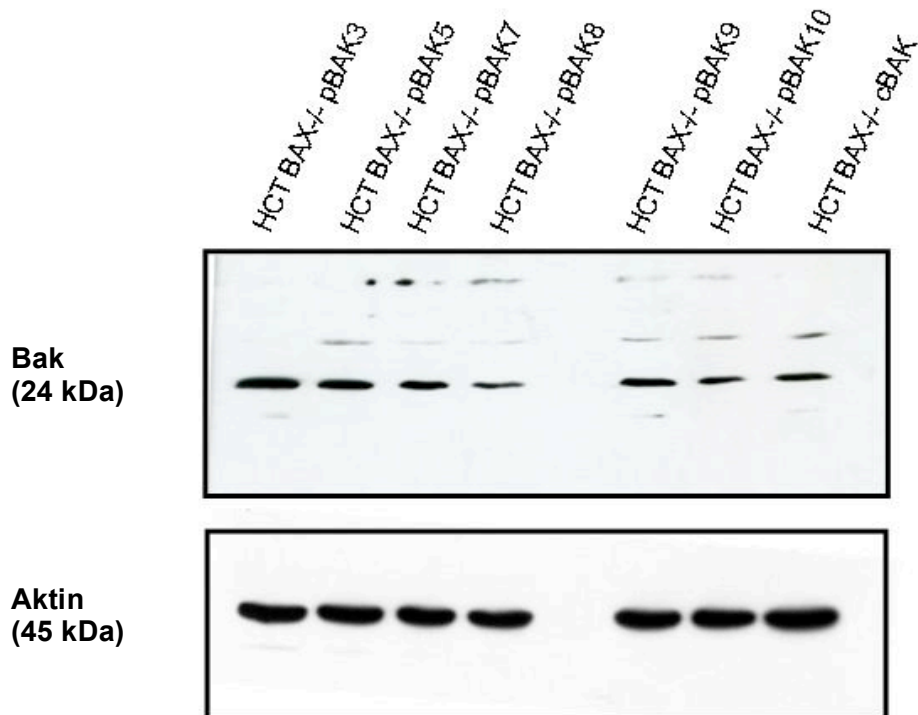


Abb. 4.14 : Screening der stabilen Zellklone auf den Gehalt an Bak. Nach Transfektion mit pSUPER bak und pBabe- puro wurden die im Selektionsmedium herangezuchteten Zellklone der Zelllinien HCT116 und HCT116 Bax^{-/-} auf ihren Gehalt an Bak untersucht. Danach wurden diejenigen Klone weitergezüchtet, die im ersten Screening einen verminderten Gehalt an Bak aufwiesen. Im oben gezeigten Fall wurden z.B. die Klone HCT BAX^{-/-} pBAK 8 und 10 weitergezüchtet. In der letzten Bahn wurden die Proteine eines kontrolltransfizierten Zellklones als Vergleichswert mit aufgetragen. Die Aktinkontrolle zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden.

Nachdem das erste Screening diejenigen Zellklone anzeigte, die im Vergleich zum jeweils mit aufgetragenen kontrolltransfizierten Zellklon eine reduzierte Menge an Bak aufwiesen, wurden diese weitergezüchtet. In der Abbildung 4.14 handelt es sich dabei um die Klone HCT BAX^{-/-} pBAK 8 und 10.

Um nun eine Aussage darüber zu erhalten, ob die vermeintliche Reduktion auch über einen längeren Zeitraum stabil sein würde, wurden die Zellklone nach ca. 14 Tagen einer erneuten Western Blot- Analyse unterzogen.

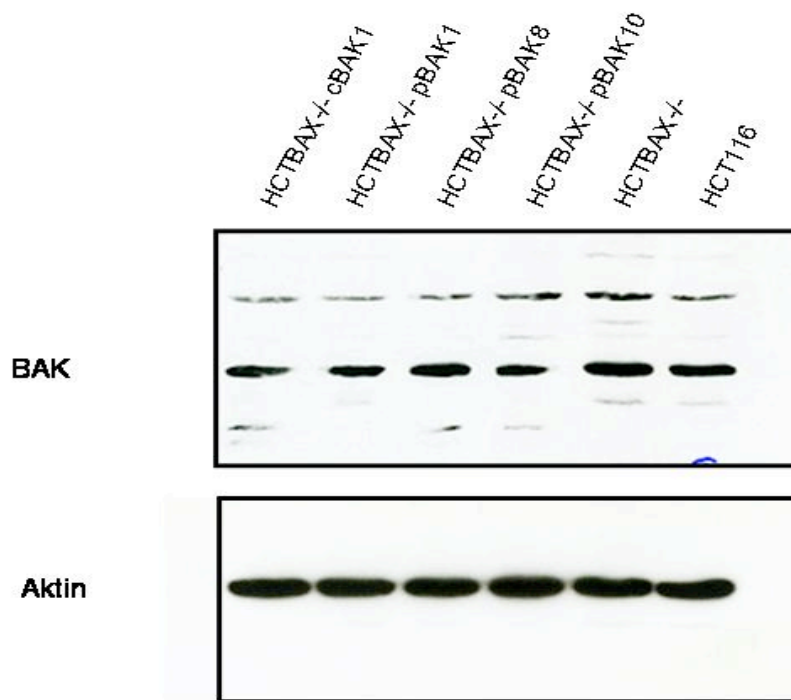


Abb. 4.15 : Erneute Proteinanalyse der weitergezüchteten Klone. Nach ca. 14 Tagen wurden die stabilen Zelllinien erneut auf ihren Gehalt an Bak untersucht. Die Reduktion, welche im ersten Screening gesehen worden war, konnte dabei allerdings nicht mehr bestätigt werden. In der Abbildung ist zu erkennen, dass dies auch für die Klone HCT BAX^{-/-} pBAK 8 und 10 gilt. Diese wiesen nun, im Vergleich zu dem auf der linken Bahn aufgetragenen kontrolltransfizierten Zellklon, keine Reduktion mehr auf.

Trotz ebenfalls gleicher aufgetragener Proteinmengen (15 µg) konnte nun aber im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen in keinem Klon mehr eine Reduktion des Bak- Proteins nachgewiesen werden. Dies soll in Abbildung 4.15 an den Klonen HCT BAX^{-/-} pBAK8 und 10 deutlich werden, welche beim ersten Screening (s. Abb. 4.14) eine mittelgradige Reduktion an Bak aufgewiesen hatten.

4.6.5 Anzahl der herangezogenen und untersuchten Zellklone

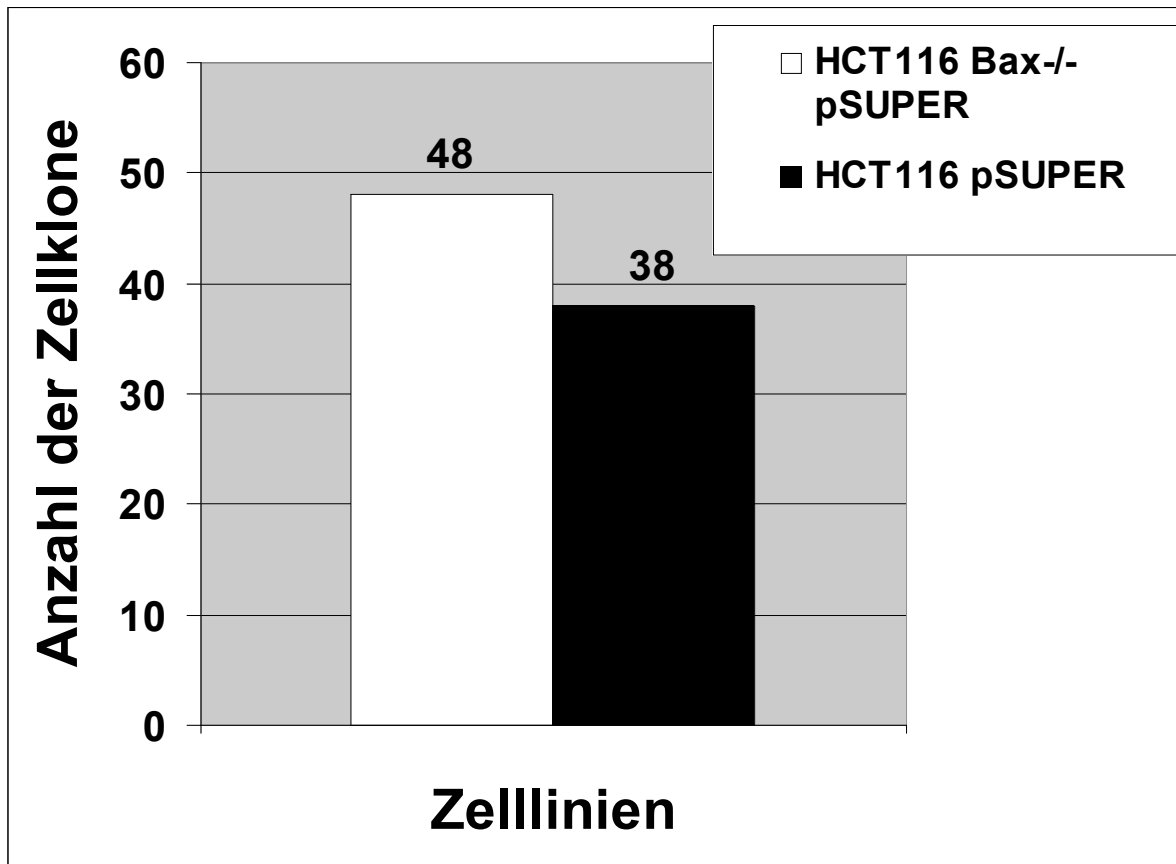


Abb. 4.16 : Anzahl der getesteten Zellklone. Es wurden per Transfektion und selektivem Wachstum insgesamt 38 Zellklone der Zelllinie HCT116 und 48 Klone der Zelllinie HCT116 Bax-/- hergestellt. Alle wurden mehrfach in der Western Blot- Analyse auf ihren Gehalt an Bak untersucht und bis zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff kultiviert.

Insgesamt wurden 48 Klone der Zelllinie HCT116 Bax-/- und 38 Klone der Zelllinie HCT116, welche mit dem pSUPER Vektor und dem Resistenzvektor pBabe- puro transfiziert worden waren, hergestellt, kultiviert und auf ihren Gehalt an Bak untersucht.

4.6.6 Gehalt an Bak- mRNA in den transfizierten Zelllinien

Nachdem unterschiedliche - und vor allem variable - Mengen des Proteins Bak im Western Blot festgestellt worden waren und auch die Reduktion des Proteins im ersten Screening nicht hinreichend ausgefallen war, entschlossen wir uns, mit Hilfe

einer RT- PCR den Gehalt an Bak- mRNA in den vektortransfizierten Zellen zu bestimmen. Dazu isolierten wir die RNA aus bereits im Western Blot untersuchten Zelllinien und beluden ein 1,5 %iges Agarosegel mit der nach der Umschreibung der mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase erhaltenen cDNA. Es wurden dabei je 1 µg bzw. 0,5 µg der Bak- cDNA eingesetzt, als Ladekontrolle wurden 1 µg bzw. 0,5 µg einer GAPDH- cDNA aufgetragen.

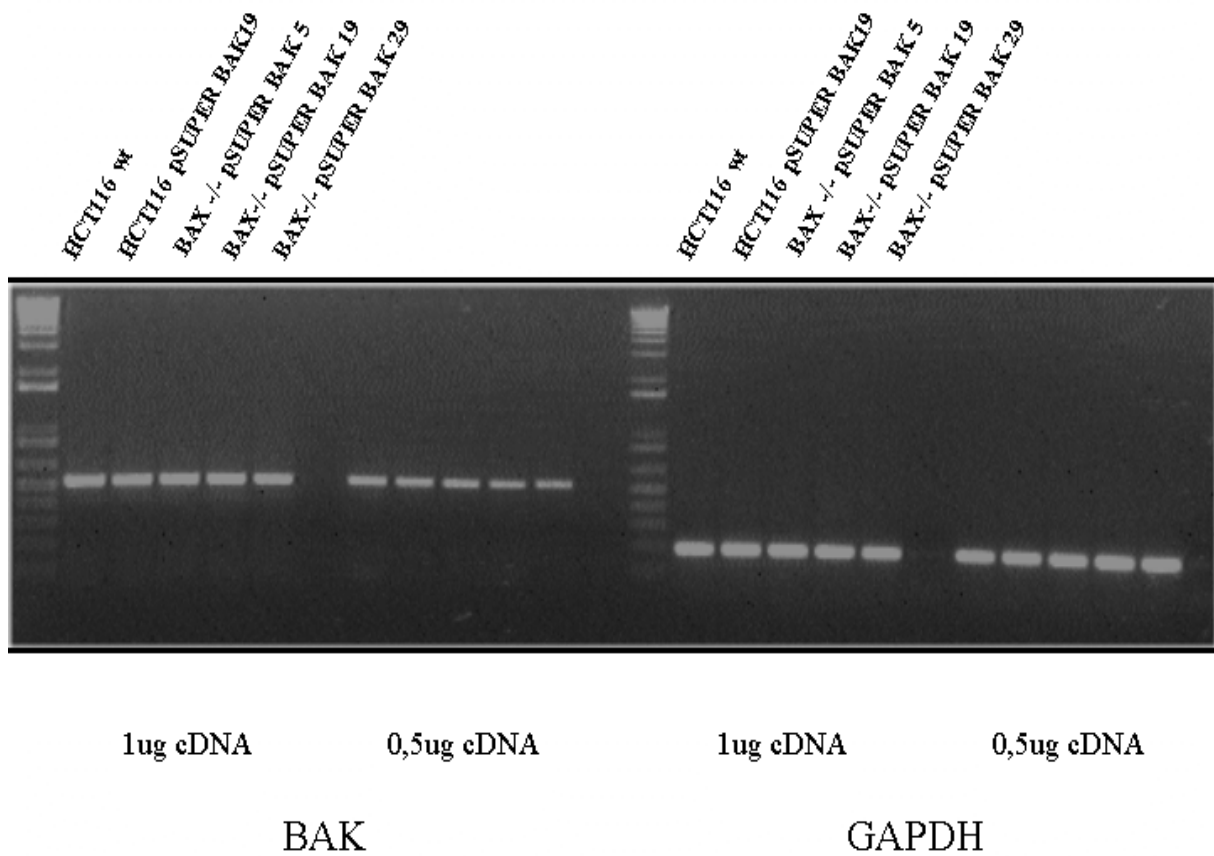


Abb. 4.17 : Ergebnis der RT- PCR zur Untersuchung auf den Gehalt an Bak- mRNA. Die erhaltenen Signale der Kontrollisolate und der RNA Isolate aus den transfizierten Zellen zeigen keinen Unterschied in ihrer Intensität. Die eingesetzte GAPDH- cDNA zeigt, dass das Gel gleichmäßig beladen wurde.

Auch auf Ebene der mRNA konnte keine Repression des bak- Gens durch den pSUPER- Vektor, welcher die in Kapitel 2.16.2 angegebene Sequenz enthielt, nachgewiesen werden.

Es wurde geschlossen, dass der pSUPER- Vektor für das vorliegende Projekt ungeeignet ist und dass zur transienten Repression mittels siRNA Technik übergegangen werden sollte.

4.7 Transiente RNA- Interferenz mittels synthetischer siRNA

Wie bereits erwähnt, besteht neben der Möglichkeit der vektorvermittelten Synthese von siRNA Stücken auch die Möglichkeit, künstlich hergestellte siRNAs in die Zelle einzuschleusen, um eine temporäre Stilllegung des entsprechenden Gens zu bewirken (s. Abb. 4.9).

Die Sequenz der siRNA zur Interferenz mit dem bak- Gen stammt aus einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Wafik S. El-Deiry (Wang und El-Deiry, 2003), die diese siRNA erfolgreich in HCT116 Zellen eingesetzt hatte.

Das Einbringen der siRNA in die Zelllinien HCT116 und HCT116 Bax^{-/-} erfolgte mittels Transfektion mit RNAiFect® der Firma Qiagen.

Da anhand der Gebrauchsanweisung des Herstellers auch nach einer Vielzahl an Versuchen keine ausreichenden Transfektionsergebnisse erzielt werden konnten, modifizierten wir das Transfektionsprotokoll.

Das von uns schliesslich erfolgreich angewandte Protokoll lautete:

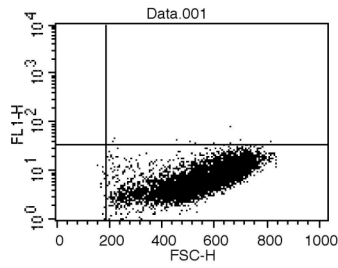
Am Tag vor der Transfektion werden $3,5 \times 10^5$ Zellen der Zelllinien HCT116 und HCT116 Bax^{-/-} in 6- Loch- Kulturplatten ausgesät, so dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70 bis 80 % erreicht wird. Die Transfektion der 6- Loch- Platten erfolgt mit dem für die 12- Loch- Platten vorgesehenen Reaktionsansatz. Dies bedeutet, dass 2 µg der siRNA zu 98 µl Transfektionspuffer addiert werden. Diese werden NICHT durch Mischen mittels Vortex, sondern durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Danach werden 12 µl des RNAiFect® Transfektionsreagenz hinzugegeben und wiederum NICHT durch maschinelles Vermischen, sondern durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Anschliessend werden die Ansätze für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die erforderlichen Komplexe formieren können. Während dieser 15 Minuten wird das Medium von den Zellen in den 6- Loch- Platten abgesaugt und ein Volumen von 300 µl frisches Mc Coy's Medium (inkl. 10 % FKS) wird auf die

Zellen gegeben. Weitere 300 µl Medium werden nach abgelaufener Zeit zu dem Transfektionsreagenz hinzugegeben und wiederum durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Letztendlich wird das Gemisch unter leichtem Schwenken auf die Platten aufgetropft. Nach einer 24stündigen Inkubation der transfizierten Zellen bei 37° C und 5 % CO₂ können die Zellen in der 6- Loch- Platte nun durch Trypsinverdau abgelöst und nach Belieben aufgeteilt werden. Somit ist neben dem ökonomischen Aspekt auch sichergestellt, dass die vor dem Versuch zu bestimmende Transfektionseffizienz für alle Ansätze gleich ist.

4.7.1 Dauer und Effizienz der Repression von Bak

4.7.1.1 Transfektionseffizienzen

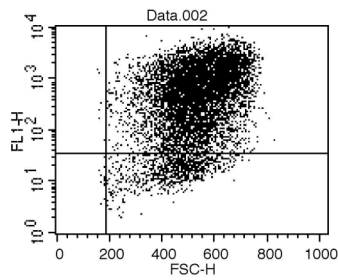
Vor jeder Transfektion der Bak- siRNA war es wichtig, zunächst die Transfektionsraten der einzusetzenden Zelllinien HCT116 und HCT116 Bax/- bezüglich der siRNAs zu überprüfen. Hierzu transfizierten wir die Zellen nach dem im Kapitel 4.7 beschriebenen Protokoll mit einer Fluoreszein (FITC)- gekoppelten siRNA und bestimmten ihre Aufnahme in die Zellen nach 5 Stunden. Als Referenz dienten jeweils mit einer irrelevanten siRNA kontrolltransfizierte Zellen. Die Auswertung erfolgte per FACS- Analyse. Die Anregung der FITC- Moleküle erfolgte bei 480 nm, das Emissionmaximum betrug 530 nm. Aus derselben „Charge“ der beiden Zelllinien erfolgte mit dem Aussäen für die Messung der Transfektionseffizienz auch das Aussäen für die Transfektion der eigentlichen Bak- siRNA. Auch die Transfektionen erfolgten zeitgleich, so dass gewährleistet war, dass das erhaltene Ergebnis der Effizienzbestimmung auch auf die Bak- siRNA transfizierten Zellen übertragbar sein würde.



File: Data.001
 Acquisition Date: 22-Sep-04
 Gated Events: 9165
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 185, 33

Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	14	0.15	0.14
LL	13	0.14	0.13
LR	9138	99.71	91.38

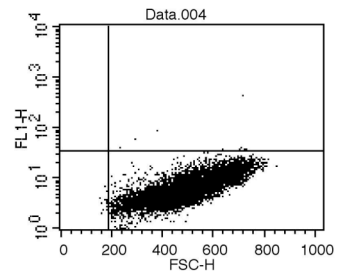


File: Data.002
 Acquisition Date: 22-Sep-04
 Gated Events: 7953
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 185, 33

Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	6	0.08	0.06
UR	7004	88.07	70.04
LL	15	0.19	0.15
LR	928	11.67	9.28

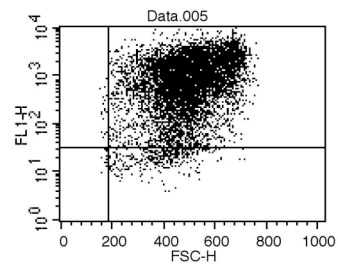
Abb. 4.18 : Transfektionseffizienz der HCT116 Zellen für siRNA. 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Absorptionsrate in einer FACS- Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca. 88 %.



File: Data.004
 Acquisition Date: 22-Sep-04
 Gated Events: 9046
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 185, 33

Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	10	0.11	0.10
LL	24	0.27	0.24
LR	9012	99.62	90.12



File: Data.005
 Acquisition Date: 22-Sep-04
 Gated Events: 7383
 X Parameter: FSC-H (Linear)
 Quad Location: 185, 33

Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	23	0.31	0.23
UR	6975	94.47	69.75
LL	17	0.23	0.17
LR	368	4.98	3.68

Abb. 4.19 : Transfektionseffizienz der HCT116 Bax-/- Zellen für siRNA. 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Absorptionsrate in einer FACS- Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca. 95 %.

Die Untersuchungen ergaben eine hinreichend hohe Transfektionseffizienz, um eine Reduktion des Bak- Proteins selbst vor dem Hintergrund kontrolltransfizierter Zellen feststellen zu können.

4.7.1.2 Verlauf der Bak- Repression in HCT116

Nachdem die Bestimmung der Transfektionseffizienzen ein ausreichendes Ergebnis erbracht hatte, erfolgten die Transfektionen der Zelllinien HCT116 und HCT116 Bax-/- mit der Bak- siRNA. Um festzustellen, in welchem zeitlichen Rahmen eine Repression des Proteins mittels synthetischer siRNA zu gewährleisten ist, erstellten wir eine Verlaufsanalyse des Proteins über sechs Tage post transfectionem. Hierzu befolgten wir das in Kapitel 4.7 beschriebene Protokoll und säten die Zellen am Tag nach der Transfektion auf 6 cm Gewebekulturschalen aus. Am zweiten, dritten, vierten, fünften und sechsten Tag nach der Transfektion der siRNA gewannen wir die Gesamtzellproteinextrakte und bestimmten den Bak- Protein- Gehalt der transfizierten Zellen in einem Immunoblot- Verfahren.

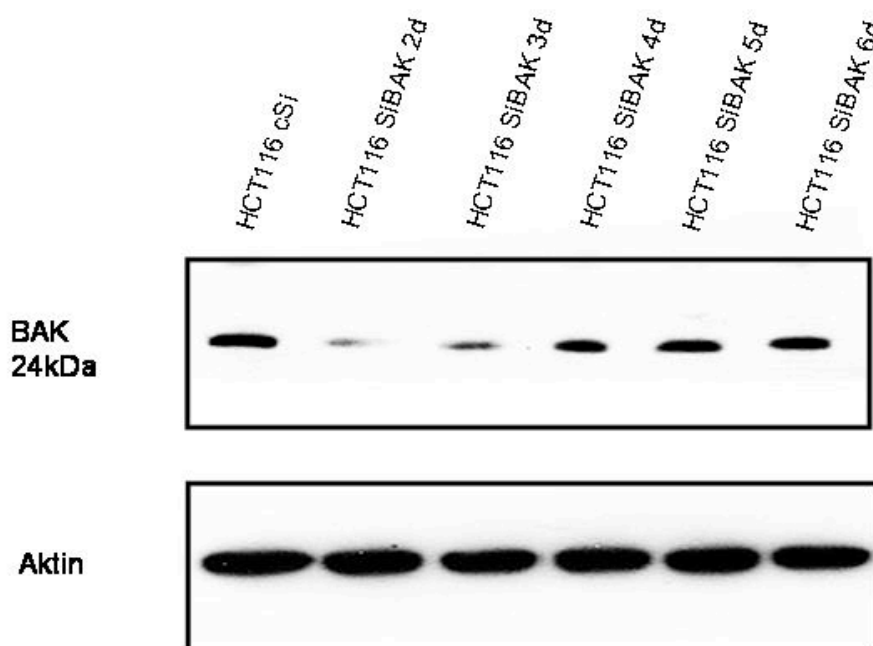


Abb. 4.20 : Verlauf der Bak- Repression in HCT116. Nach Transfektion der HCT116 Zellen wurden Gesamtzellproteinextrakte nach 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen gewonnen. Die erste Bande beschreibt eine mit einer non- silencing siRNA durchgeführte Kontrolltransfektion und galt als Referenzwert für den Grad der Repression. Der Beta- Aktin- Nachweis wurde als Ladekontrolle angefertigt. Es ist zu erkennen, dass die Bak- Proteinmenge zwei Tage post transfectionem (p.t.) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen stark verringert war. Eine mittelgradige Verringerung bestand auch noch nach Tag 3 p.t.. Ab Tag 4 p.t. war keine signifikante Repression des Proteins mehr nachweisbar.

Neben den extrahierten Proteinen aus dem Zeitverlauf wurde auf der ersten Bahn ein Proteinextrakt aus Zellen aufgetragen, die mit einer non-silencing siRNA kontrolltransfiziert worden waren. Dieser Wert galt als Referenzwert zur Beurteilung des Grades der Repression von Bak. Wie dem Ergebnis des Western Blot entnommen werden kann, war zwei Tage nach der Transfektion eine beachtliche Reduktion des Proteins erreicht worden. Auch am 3. Tag post transfectionem (p.t.) war diese Reduktion noch mittelgradig ausgeprägt. Ab Tag 4 p.t. war keine signifikante Verringerung von Bak in HCT116 Zellen mehr nachweisbar.

4.7.1.3 Verlauf der Bak Repression in HCT116 Bax^{-/-}

Die Versuchsanordnung in diesem Fall erfolgte analog zu der in Kapitel 4.7.1.2. Der Unterschied bestand jedoch in der verwendeten Zelllinie, welche in diesem Versuch HCT116 Bax^{-/-} war.

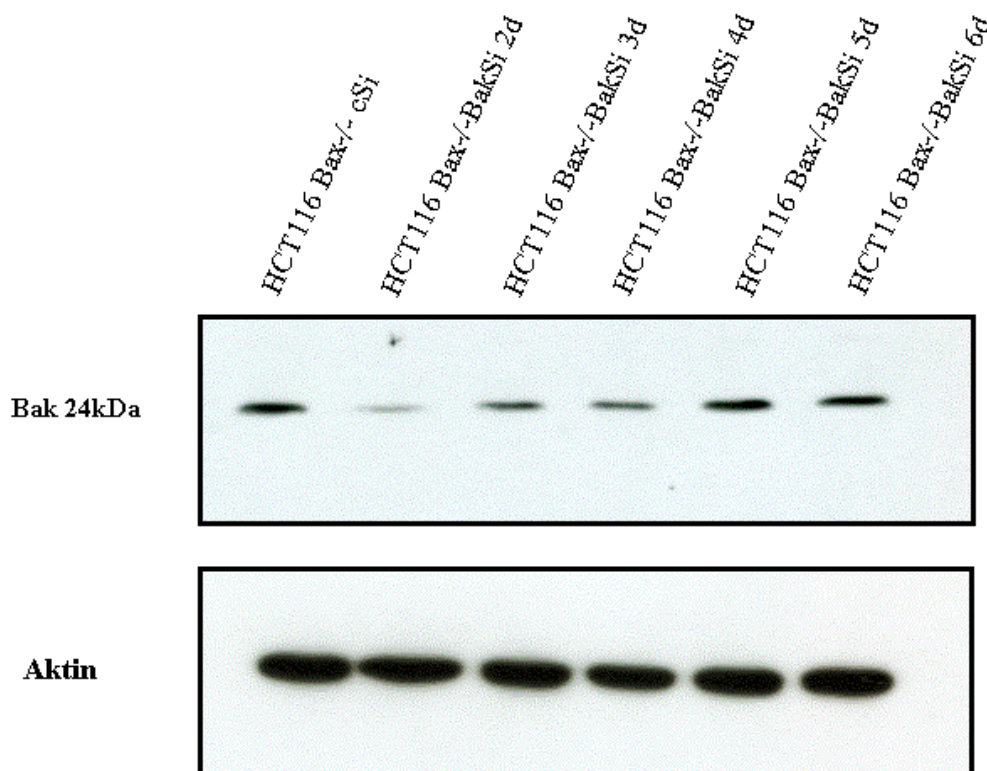


Abb. 4.21 : Verlauf der Bak- Repression in HCT116 Bax^{-/-}. Nach Transfektion der HCT116 Bax^{-/-} Zellen wurden Gesamtzellproteinextrakte nach 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen gewonnen. Die erste Bande beschreibt eine mit einer non-silencing siRNA durchgeführte Kontrolltransfektion und galt als Referenzwert für den Grad der Repression. Der Beta- Aktin- Nachweis wurde als Ladekontrolle angefertigt. Es ist zu erkennen, dass die Bak- Proteinmenge zwei Tage post transfectionem (p.t.) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen deutlich verringert war. Eine mittelgradige Verringerung bestand auch noch nach Tag 3 und 4p.t.. Ab Tag 5 p.t. war keine signifikante Repression des Proteins mehr nachweisbar.

Auch hier wurde neben den extrahierten Proteinen aus dem Zeitverlauf auf der ersten Bahn ein Proteinextrakt aus Zellen aufgetragen, die mit einer non-silencing siRNA kontrolltransfiziert worden waren. Dieser Wert galt als Referenzwert zur Beurteilung des Grades der Repression von Bak. Wie auch dem Ergebnis dieses Western Blots entnommen werden kann, war nach zwei Tagen eine erkennbare Reduktion des Proteins festzustellen. Auch am 3. und 4. Tag post transfectionem (p.t.) war diese Reduktion noch mittelgradig ausgeprägt. Ab Tag 5 p.t. ließ die Wirkung der RNA-Interferenz jedoch so deutlich nach, dass keine Verringerung von Bak in HCT116 Bax^{-/-} Zellen mehr nachweisbar war.

4.8 Wirkung von Resveratrol in Abhängigkeit von Bak und Bax

4.8.1 Abhängigkeit von Bax

Nachdem wir die Bedingungen soweit optimiert hatten, dass wir Bak mittels transienter siRNA Transfektion deutlich reduzieren konnten, wagten wir uns an die Untersuchung darüber, welche Rolle dem proapoptotischen BCL-2-Protein Bak in der Resveratrol-vermittelten Apoptose zukommt.

Bisher waren diese Analysen nur für das Protein Bax durchgeführt worden (Mahyar-Roemer et al., 2002). In diesem Projekt unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass HCT116 Bax^{-/-} Zellen nach Resveratrolbehandlung eine deutlich geringere Apoptoserate zeigten, als HCT- Zellen, in denen Bax noch vorhanden war. Jedoch wurde auch deutlich, dass die Apoptose trotz des Wegfalls von Bax nicht vollständig zum Erliegen kam, was das Vorhandensein weiterer Effektoren implizierte.

Eine Wiederholung der Exposition von HCT116 und HCT116 Bax^{-/-} Zellen mit Resveratrol im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten diese ursprünglichen Resultate bestätigen: Die Abwesenheit von Bax reduziert zwar die apoptotische Antwort auf Resveratrol, hebt sie aber nicht völlig auf (s. Abb. 4.22).

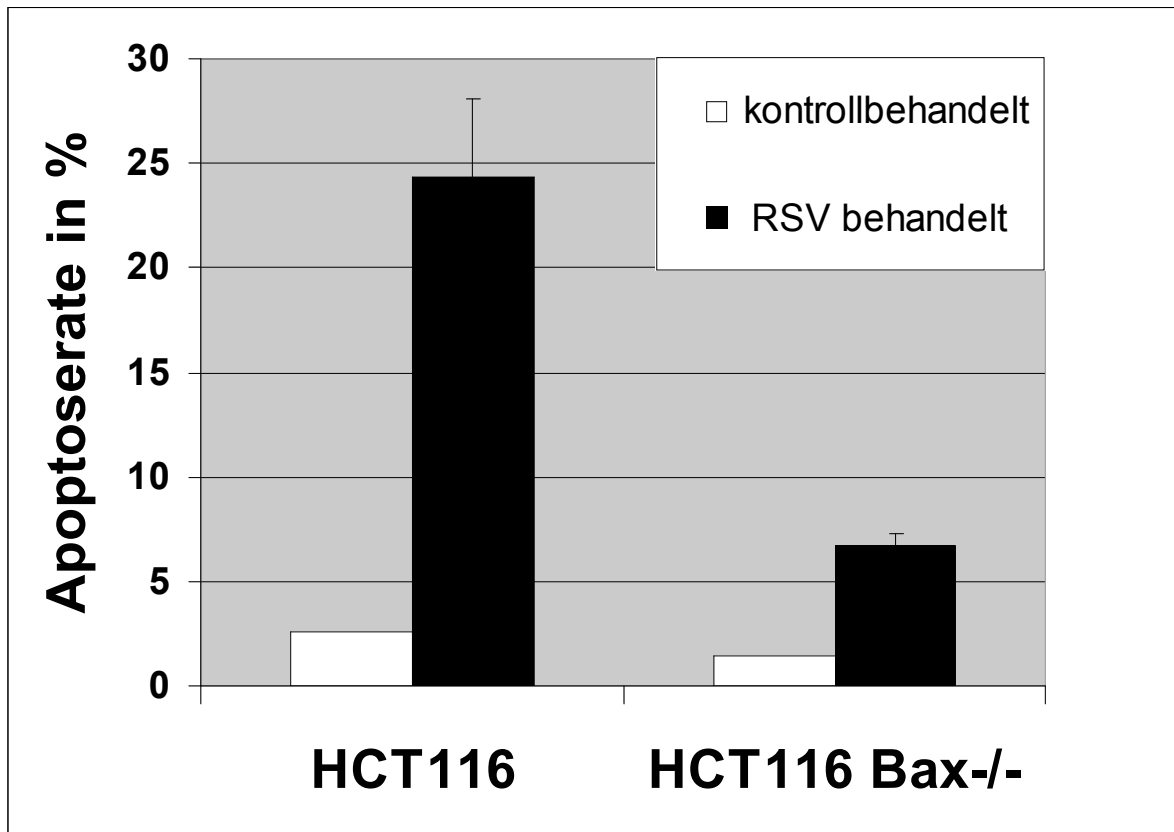


Abb. 4.22 : Abhängigkeit der Resveratrol- induzierten Apoptose von Bax. Wie von unserer Arbeitsgruppe bereits früher beobachtet, wird die Apoptoserate nach Resveratrolbehandlung (100 μ M; 24 h) stark reduziert, wenn es zum Wegfall des Proteins Bax kommt. Jedoch wird die Apoptose nicht gänzlich aufgehoben, was auf das Vorhandensein weiterer Effektoren hinweist.

4.8.2 Die Rolle von Bak im Rahmen der Resveratrol- induzierten Apoptose

Um bestimmen zu können, welche Rolle Bak in der Resveratrol- induzierten Apoptose einnimmt, welche Stellung ihm neben Bax zuzuordnen ist und was passiert, wenn beide Proteine ausgeschaltet werden, erzeugten wir folgende Zustände per siRNA Transfektion :

HCT116 cSi : Wildtyp HCT116- Zellen, die mit der Kontroll- siRNA transfiziert wurden (\Rightarrow **Bax + / Bak +**).

- HCT116 BakSi:** Wildtyp HCT116- Zellen, defizient für das Bak- Protein
(\Rightarrow **Bax + / Bak -**).
- HCT116 Bax-/- cSi:** HCT116- Zellen, denen das Protein Bax durch homologe Rekombination entzogen worden war und die mit der Kontroll- siRNA transfiziert worden waren
(\Rightarrow **Bax - / Bak +**).
- HCT116 Bax-/- BakSi :** HCT116 Bax-/- Zellen, defizient für das Bak- Protein
(\Rightarrow **Bax - / Bak -**).

Die Transfektion der entsprechenden Zelllinien erfolgte nach dem in Kapitel 4.7 beschriebenen Protokoll.

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen aus den 6- Loch- Platten abgelöst, in 5 ml Mc Coy's Medium plus 10 % FKS aufgenommen und Volumina zwischen 100 μ l (72- Stunden- Ansatz) und 500 μ l (24- Stunden- Ansatz) wurden auf 12- Loch- Platten umgesetzt. Dabei wurden pro jeder o.g. Zelllinie drei Ansätze erstellt. Die Zellen wurden in 1,5 ml Mc Coy's Medium inklusive 10 % FKS und 100 μ M Resveratrol aufgenommen. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit einem Medium, welches an Stelle des Resveratrol dessen Lösungsmittel, DMSO, enthielt. Die Konzentration von 100 μ M Resveratrol war in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe als die ideale Konzentration zur Induktion von Apoptose ermittelt worden (Mahyar- Roemer et al., 2002).

Die Behandlung der Zellen wurde entsprechend nach 24, 48 und 72 Stunden abgestoppt, indem die Zellen mit Methanol fixiert wurden. Nach einem RNase- Verdau erfolgte dann eine Färbung mit Propidiumiodid (PI). Dieses interkaliert mit der DNA und liefert in der FACS- Analyse somit eine Information über die Zellzyklusverteilung. Entsprechend dem DNA- Gehalt der Zelle sendet diese nach Laseranregung ein Lichtsignal aus. Je mehr DNA in der Zelle enthalten ist, desto mehr PI kann in diese interkalieren, desto mehr Fluoreszenz wird von der Zelle emittiert. Den dabei entstehenden Spitzen bzw. Fraktionen der Auswertung von 10000 Zellen können dann Zellzyklusphasen zugeordnet werden (s. Abb. 4.23). Die mit M1 bezeichnete Fraktion stellt in diesem Fall den Anteil der Zellen dar, der weniger als den diploiden Chromosomensatz enthält und welcher mit dem Anteil an

apoptotischen Zellen gleichgesetzt wird. Der mit M2 bezeichnete Peak zeigt die Anzahl der Zellen in der Gap (G)- 1- Phase des Zellzyklus. In dieser Phase enthalten die Zellen den zweifachen Chromosomensatz ($2n$). Der M3- Peak entspricht Zellen in der Synthese (S)- Phase. Da die Zellen während dieser Zeit ihren DNA- Gehalt zur anschliessenden Zellteilung verdoppeln, liegt der gemessene DNA- Gehalt dieser Zellen zwischen $2n$ und $4n$. Der letzte Peak (M4) stellt den Anteil der Zellen dar, die sich in der Gap (G)- 2- Phase bzw. in der Mitose (M)- Phase befinden. In diesem Stadium enthalten die Zellen den vierfachen Satz an Chromosomen. Die dahinter liegende Fraktion der Zellen enthält polyploide Chromosomensätze (M5).

Für die vorliegende Arbeit wurde ausschliesslich auf die sub- $2n$ - Fraktion Wert gelegt. Sub- $2n$ bedeutet, dass in den Zellen, welche ein solches Signal ergeben, der in lebensfähigen Zellen mindestens vorhandene doppelte Chromosomensatz abgebaut worden ist. Dies geschieht durch Endonukleasenaktivität, welche im Zusammenhang mit apoptotischem Zelltod zu beobachten ist.

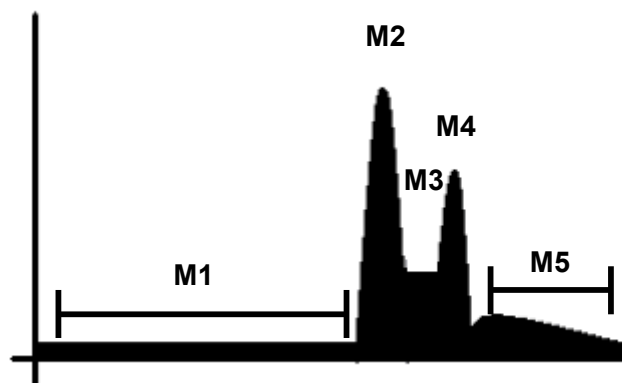
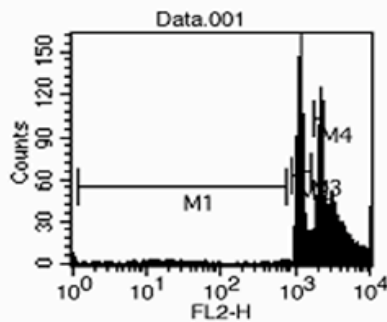


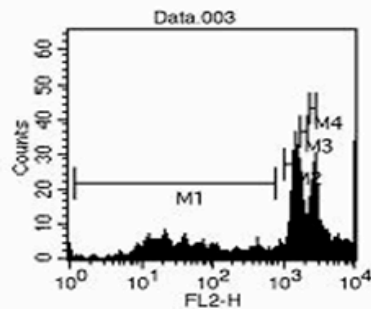
Abb. 4.23 : Zellzyklusverteilung, gemessen in der FACS- Analyse (Grundprinzip). Entsprechend ihrem DNA- Gehalt lagern die Zellen unterschiedliche Mengen an Propidiumiodid (PI) ein. Die nach Anregung durch einen Laser emittierte Fluoreszenz entspricht somit dem Gehalt an DNA, woraus sich schliessen lässt, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet (s. Text in Kapitel 4.8.2). M1 stellt den Anteil der Zellen dar, welche einen Chromatingehalt von unter $2n$ (diploider Chromosomensatz) enthalten, was der Fraktion der apoptotischen Zellen entspricht. M2 bezeichnet Zellen in der G1- Phase. Diese enthalten den doppelten Chromosomensatz ($2n$), M3 sind Zellen in der S- Phase mit einem Gehalt zwischen $2n$ und $4n$ und M4 solche Zellen, welche sich in der G2- bzw. M- Phase befinden und entsprechend $4n$ besitzen. Die danach folgenden Zellen sind polyploid (M5).

Die im Folgenden eingefügten Bilder sind repräsentativ für alle Ansätze und Zeitpunkte des Zeitverlaufs. Die Ergebnisse wurden jeweils durch Folgeversuche (s. Abb. 4.31) bestätigt.

HCT116 cSi, kontrollbehandelt, 24h

File: Data.001
 Acquisition Date: 13-Oct-04
 Gated Events: 7326
 X Parameter: FL2-H (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000

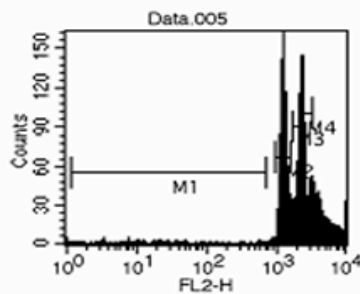
Marker	Left, Right	Events	% Gated
All	1, 991C	7326	100.00
M1	1, 75C	187	2.55
M2	866, 120E	2111	28.82
M3	1263, 1655	526	7.18
M4	1685, 2371	1884	25.72

HCT116 cSi, RSV- behandelt, 24h

File: Data.003
 Acquisition Date: 13-Oct-04
 Gated Events: 2800
 X Parameter: FL2-H (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000

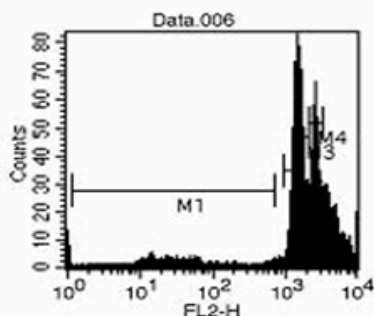
Marker	Left, Right	Events	% Gated
All	1, 991C	2800	100.00
M1	1, 75C	755	26.96
M2	1000, 1640	848	30.29
M3	1685, 2148	239	8.54
M4	2247, 2813	353	12.96

Abb. 4.24 : FACS- Daten der HCT116 cSi Zellen. Diese Zelllinie enthielt sowohl Bax als auch Bak. Das Segment M1 beinhaltet die sub- 2n- Fraktion, was den apoptotischen Zellen entspricht. In den kontrollbehandelten Zellen lag die Apoptoserate bei 2,55 %, in den Resveratrol (100 µM)-behandelten Zellen bei 26,96 %.

HCT116 bax-/- cSi, kontrollbehandelt, 24 h

File: Data.005
 Acquisition Date: 13-Oct-04
 Gated Events: 8325
 X Parameter: FL2-H (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated
All	1, 991C	8325	100.00
M1	1, 75C	121	1.45
M2	1000, 1640	2989	35.90
M3	1685, 2148	1658	19.92
M4	2227, 3220	1494	17.95

HCT116 bax-/- cSi, RSV- behandelt, 24 h

File: Data.006
 Acquisition Date: 13-Oct-04
 Gated Events: 5737
 X Parameter: FL2-H (Log)
 Log Data Units: Linear Values
 Gate: G1
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated
All	1, 991C	5737	100.00
M1	1, 75C	407	7.09
M2	1000, 1640	2206	38.45
M3	1685, 2148	613	10.69
M4	2227, 3220	1233	21.49

Abb. 4.25 : FACS- Daten der HCT116 Bax-/- cSi Zellen. Diese Zelllinie enthielt nur Bak. In den kontrollbehandelten Zellen lag die Apoptoserate bei 1,45 %, in den Resveratrol (100 µM)-behandelten Zellen bei 7,09 %.

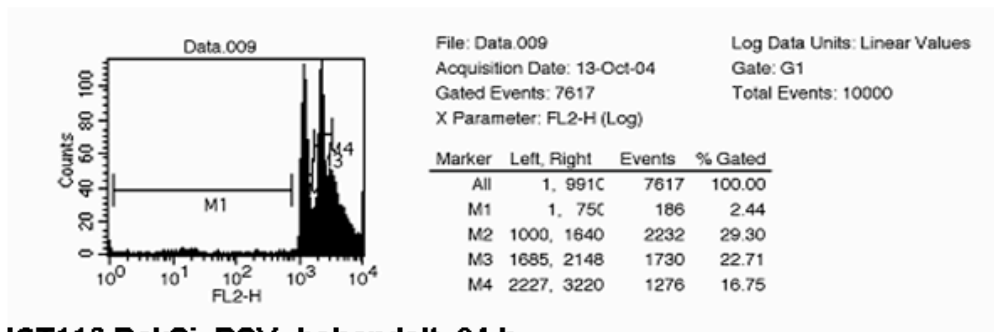
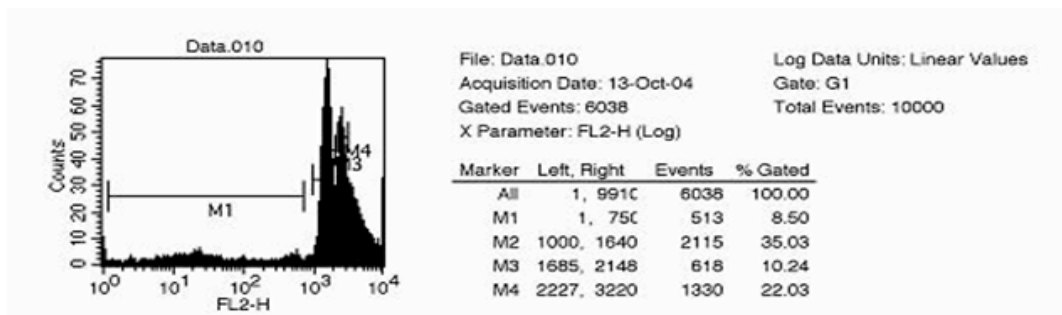
HCT116 BakSi, kontrollbehandelt, 24 h**HCT116 BakSi, RSV- behandelt, 24 h**

Abb. 4.26 : FACS- Daten der HCT116 BakSi Zellen. Diese Zelllinie enthielt nur Bax. In den kontrollbehandelten Zellen lag die Apoptoserate bei 2,44 %, in den Resveratrol (100 μ M)-behandelten Zellen bei 8,5 %.

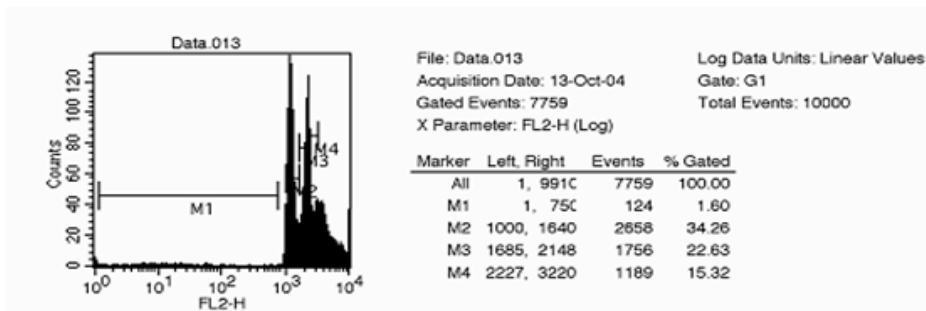
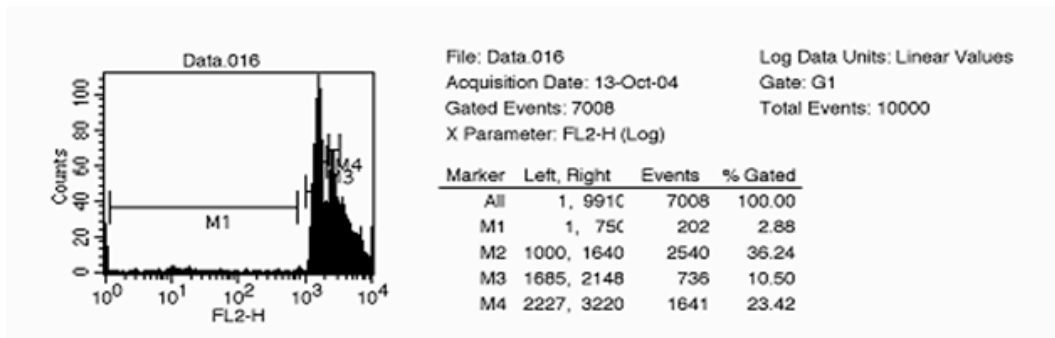
HCT116 bax-/- BakSi, kontrollbehandelt, 24 h**HCT116 bax-/- BakSi, RSV- behandelt, 24 h**

Abb. 4.27 : FACS- Daten der HCT116 Bax-/- BakSi Zellen. Diese Zelllinie enthielt weder Bax noch Bak. In den kontrollbehandelten Zellen lag die Apoptoserate bei 1,6 %, in den Resveratrol (100 μ M)-behandelten Zellen bei 2,88 %.

Die statistische Auswertung aller erhobenen Daten aus dem Zeitverlauf ergab folgende Zelltodantworten nach Resveratrolbehandlung :

4.8.2.1 24- Stunden- Resveratrolbehandlung

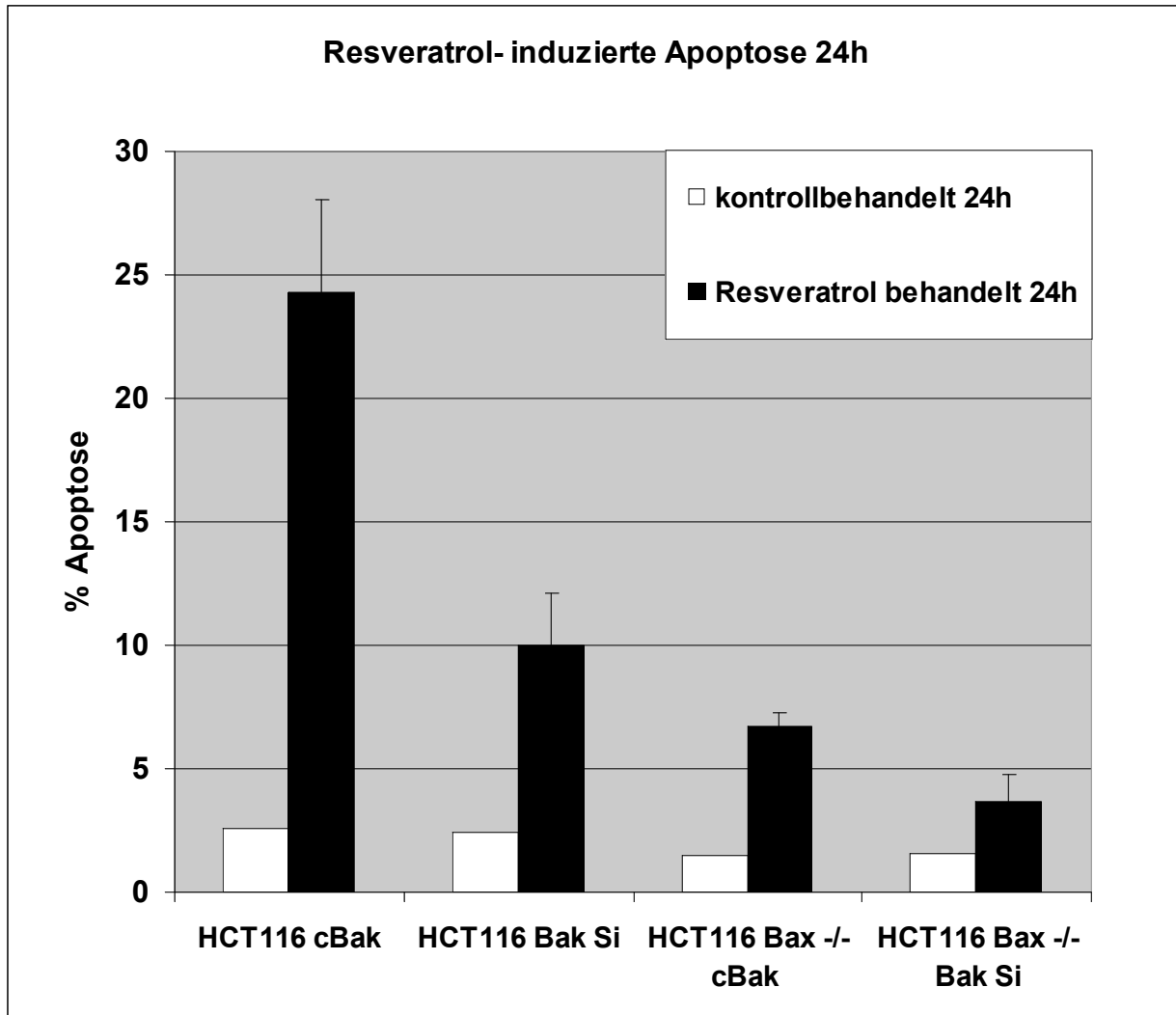


Abb. 4.28 : Induzierbarkeit der Apoptose durch 24stündige Behandlung mit Resveratrol. Der Unterschied der behandelten Zelllinien lag in ihrem Gehalt an Bak / Bax (s. Kapitel 4.8.2). Der Durchschnittswert der RSV- behandelten Zellen wurde aus drei Ansätzen gebildet. Die jeweils linke Säule stellt die Apoptoserate der entsprechenden kontrollbehandelten Zellen dar, die jeweils rechte Säule die Apoptoserate der mit 100 μ M Resveratrol behandelten Zellen. Die Apoptose der HCT116 cBak (Bak + / Bax +) lag mit ca. 24 % am höchsten, gefolgt von HCT116 BakSi (Bak - / Bax +) mit ca. 10 %. Dahinter folgten die HCT116 Bax-/- cBak (Bak + / Bax -) mit ca. 7 % und die wenigste Apoptose nach RSV- behandlung zeigten HCT116 Bax-/- BakSi (Bak - / Bax -) mit ca. 3 %.

Den mit der Bak- siRNA transfizierten Zellen ist in diesem Ansatz der Bak- Gehalt zwei Tage post transfectionem zuzuordnen (s. Kapitel 4.7.1.2 und 4.7.1.3). Der aus drei Ansätzen ermittelte Mittelwert ergab eine Apoptoserate von ca. 24 % für

HCT116 cBak (Bak + / Bax +), eine Rate von ca. 10 % für die HCT116 BakSi (Bak - / Bax +), gefolgt von HCT116 Bax -/- cBak (Bak + / Bax -) mit ca. 7 % Apoptose nach Resveratrolbehandlung. Die niedrigste Apoptoserate wiesen HCT116 Bax -/- BakSi (Bak - / Bax -) mit ca. 3 % Apoptose auf. Diese Resultate zeigten zunächst, dass die Abwesenheit von Bax die Kolontumorzellapoptose durch RSV beeinträchtigt, RSV also Bax für die effiziente Eliminierung von Kolontumorzellen benötigt. Dies bestätigte unsere Erkenntnisse aus vorangegangenen Untersuchungen (Mahyar-Roemer et al., 2001). Darüber hinaus zeigten diese Resultate, dass die bei Abwesenheit von Bax verbleibende Apoptosefähigkeit unter RSV von Bak vermittelt wird.

4.8.2.2 48- Stunden- Resveratrolbehandlung

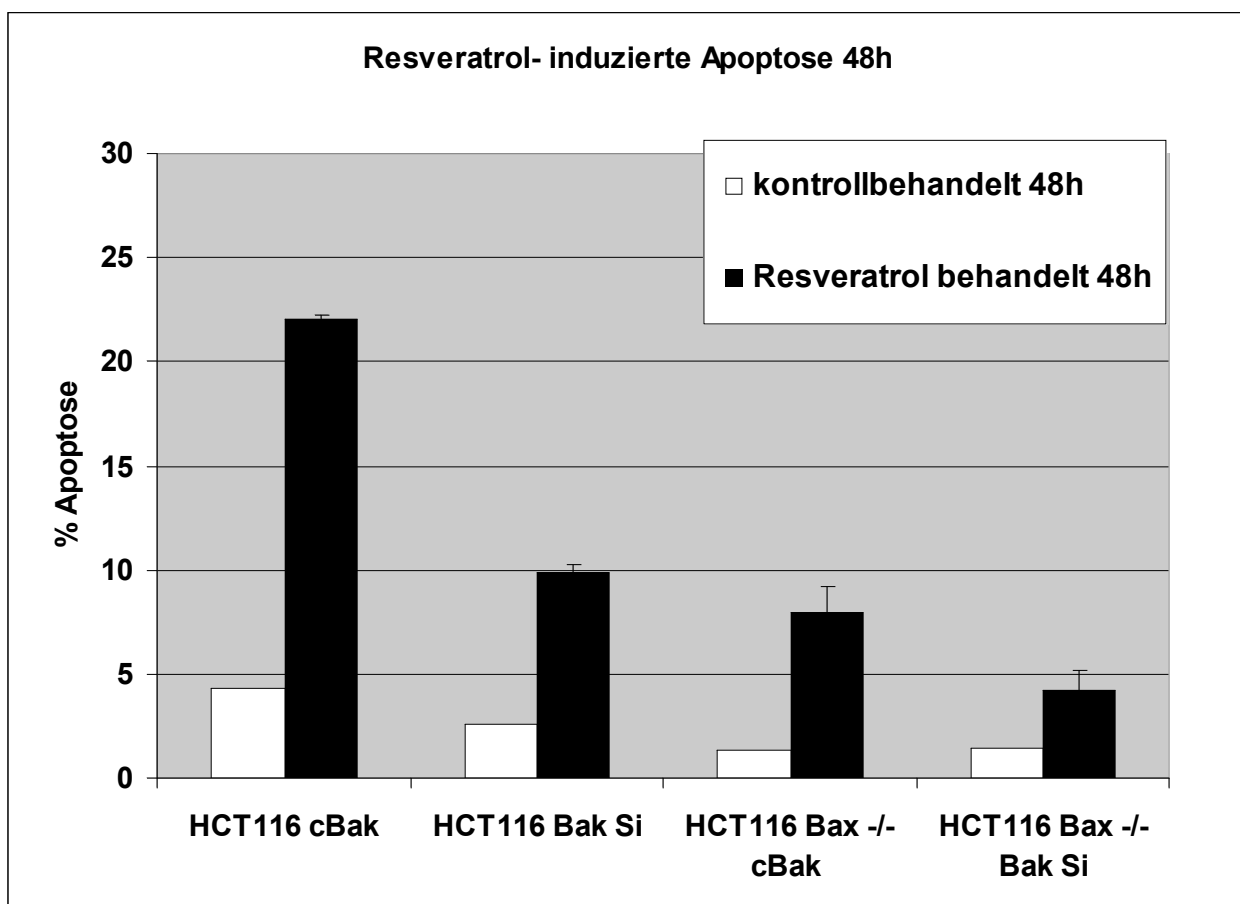


Abb. 4.29 : Induzierbarkeit der Apoptose durch 48stündige Behandlung mit Resveratrol. Der Unterschied der behandelten Zelllinien lag in ihrem Gehalt an Bak / Bax (s. Kapitel 4.8.2). Der Durchschnittswert der RSV- behandelten Zellen wurde aus drei Ansätzen gebildet. Die jeweils linke Säule stellt die Apoptoserate der entsprechenden kontrollbehandelten Zellen dar, die jeweils rechte Säule die Apoptoserate der mit 100 μ M Resveratrol behandelten Zellen. Die Apoptose der HCT116 cBak (Bak + / Bax +) lag mit ca. 22 % am höchsten, gefolgt von HCT116 BakSi (Bak - / Bax +) mit ca. 10 %. Dahinter folgten die HCT116 Bax -/- cBak (Bak + / Bax -) mit ca. 8 % und die wenigste Apoptose nach RSV- behandlung zeigten HCT116 Bax -/- BakSi (Bak - / Bax -) mit ca. 4 %. Das Ergebnis spiegelt im Wesentlichen das des 24- Stunden-Diagramms wider.

Das Ergebnis der 48- stündigen Behandlung der einzelnen Zelltypen spiegelt im Wesentlichen das des 24- Stunden- Ansatzes wider. Auch hier war in den HCT116 cBak die höchste Apoptoserate zu verzeichnen (22 %), gefolgt von HCT116 BakSi (10 %), HCT116 Bax-/- cBak (8 %). Den geringsten Zelltod wiesen auch hier die für Bak und Bax defizienten HCT116 Bax-/- BakSi (4 %) auf. Der Bak- Gehalt der Bak- siRNA transfizierten Zellen entsprach Tag 3 post transfectionem aus Kapitel 4.7.1.2 und 4.7.1.3.

4.8.2.3 72- Stunden- Resveratrolbehandlung

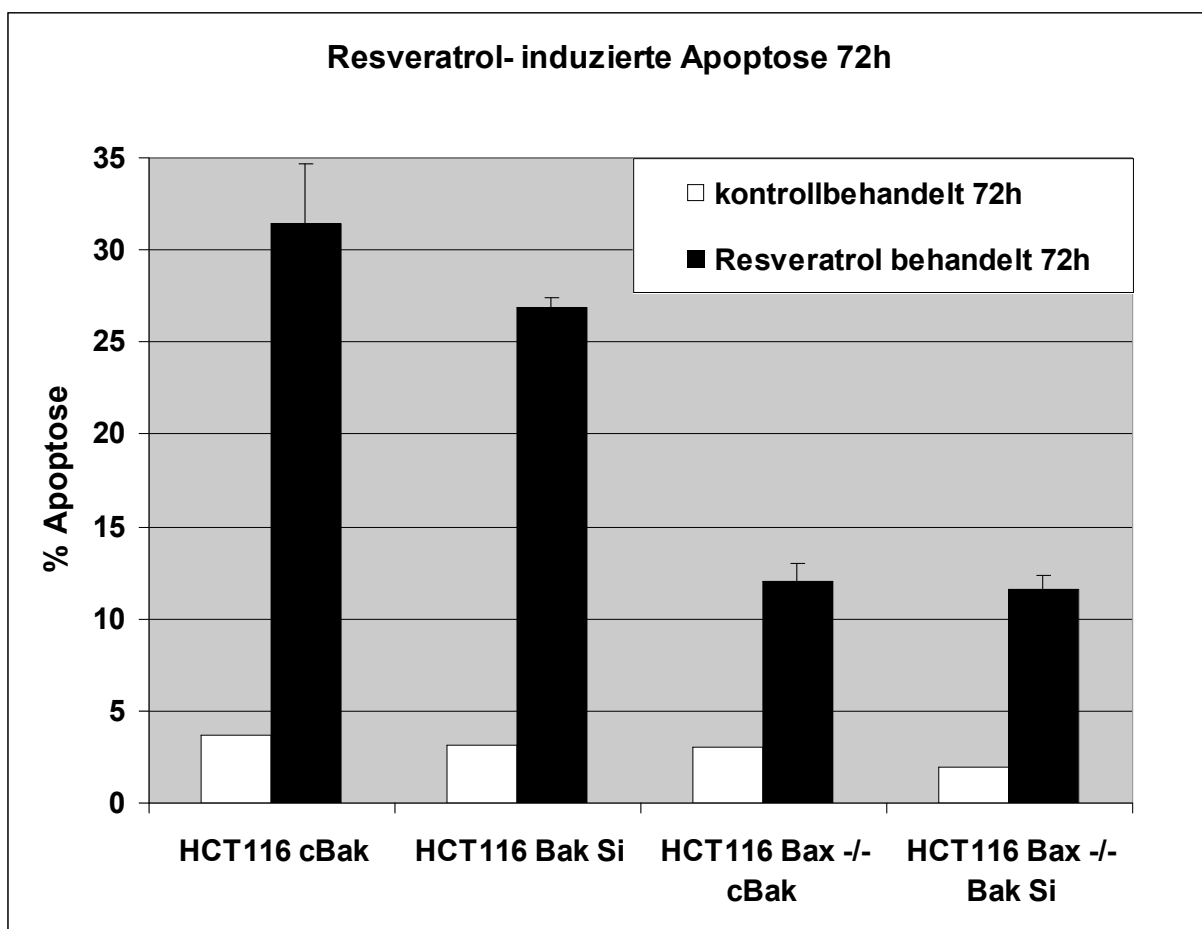
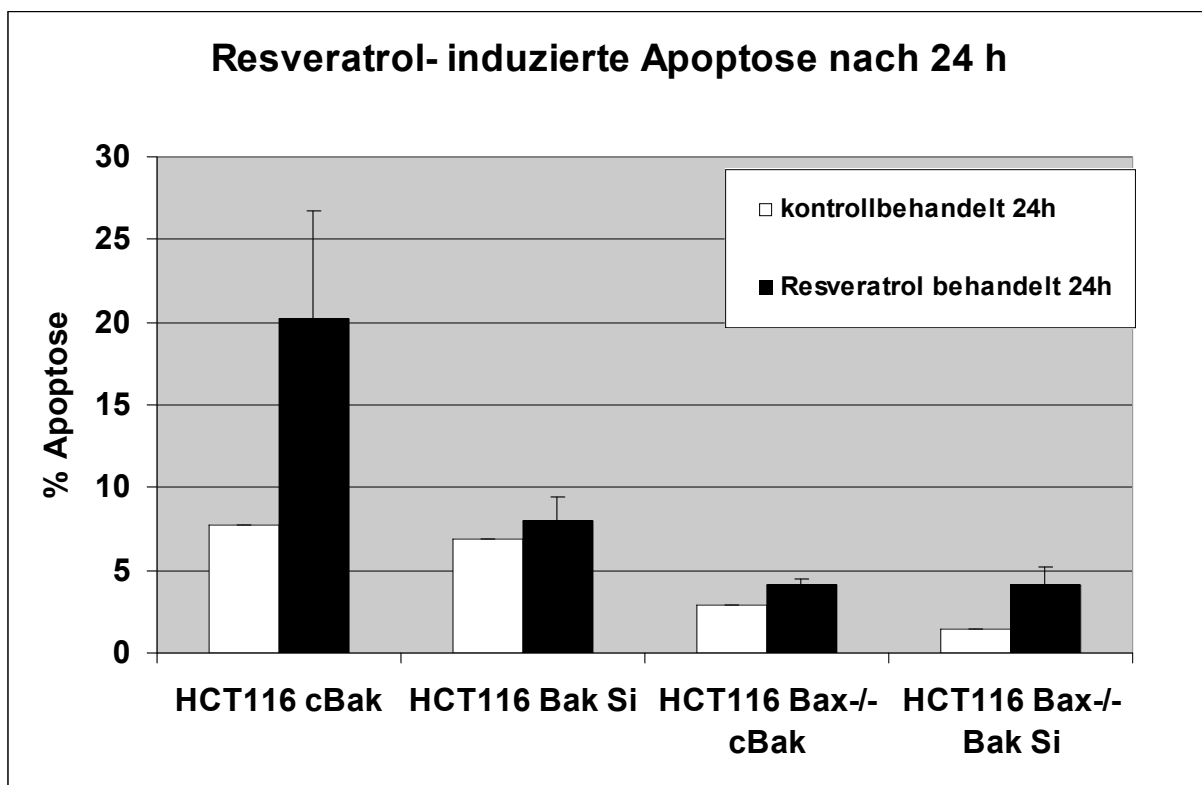


Abb. 4.30 : Induzierbarkeit der Apoptose durch 72stündige Behandlung mit Resveratrol. Der Unterschied der behandelten Zelllinien lag in ihrem Gehalt an Bak / Bax (s. Kapitel 4.8.2). Der Durchschnittswert der RSV- behandelten Zellen wurde aus drei Ansätzen gebildet. Die jeweils linke Säule stellt die Apoptoserate der entsprechenden kontrollbehandelten Zellen dar, die jeweils rechte Säule die Apoptoserate der mit 100 μ M Resveratrol behandelten Zellen. Die Apoptose der HCT116 cBak (Bak + / Bax +) lag mit ca. 31 % am höchsten, gefolgt von HCT116 BakSi (Bak - / Bax +) mit ca. 26 %. Dahinter folgten die HCT116 Bax-/- cBak (Bak + / Bax -) und die HCT116 Bax-/- BakSi (Bak - / Bax -) mit jeweils ca. 12 % Apoptose nach RSV- Behandlung.

Da der Bak- Gehalt der Bak- siRNA transfizierten Zellen nach 72 Stunden fast wieder dem der kontrolltransfizierten Zellen entsprach (Tag 4 p.t. ; Kapitel 4.7.1.2 und 4.7.1.3), waren keine größeren Unterschiede bei der RSV- induzierten Apoptose zu erwarten, was durch die Statistik bestätigt wird. HCT116 cBak und HCT116 BakSi lagen mit 31 % bzw. 26 % sehr nahe beieinander. Auch HCT116 Bax-/- cBak und HCT116 Bax-/- BakSi wiesen mit je 12 % Apoptose gleiche Werte auf. Die 72 h- Werte bestätigten so auf eindrucksvolle Weise, dass die zuvor beobachteten Unterschiede in der Zelltodantwort tatsächlich mit der Abwesenheit des Bak- Proteins korrelieren.

Es wurden anschliessend weitere analoge Versuchsreihen durchgeführt, in denen aus jeweils dreifachen Ansätzen ein Mittelwert berechnet wurde. Aus unbekanntem Grund lag in diesen Ansätzen die basale Apoptoserate der kontrolltransfizierten und kontrollbehandelten Zellen höher als in o.g. Versuch. Jedoch zeigte sich auch hier, ungeachtet der höheren basalen Apoptoserate, dass der RSV- induzierte Zelltod in HCT116 Kolontumorzellen überwiegend von Bax und Bak abhängt.

4.8.2.4 Wiederholung der Versuche aus Kapitel 4.8.2.1, 4.8.2.2 und 4.8.2.3



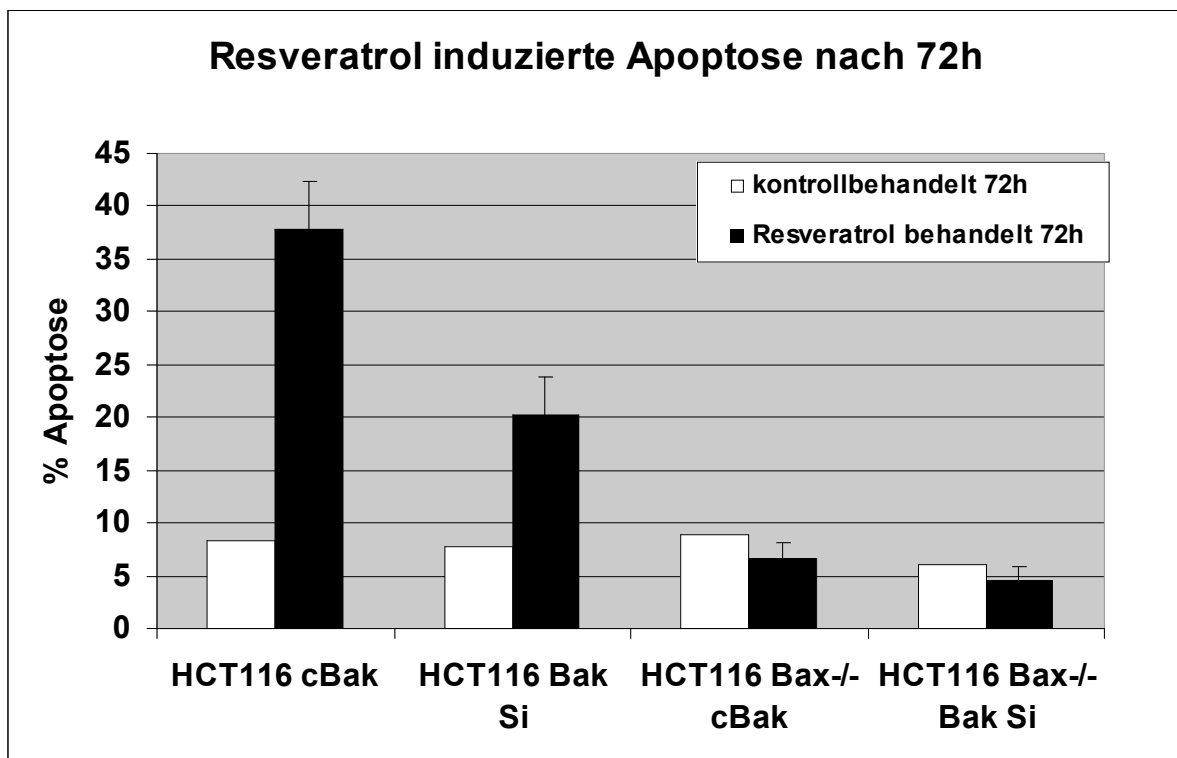
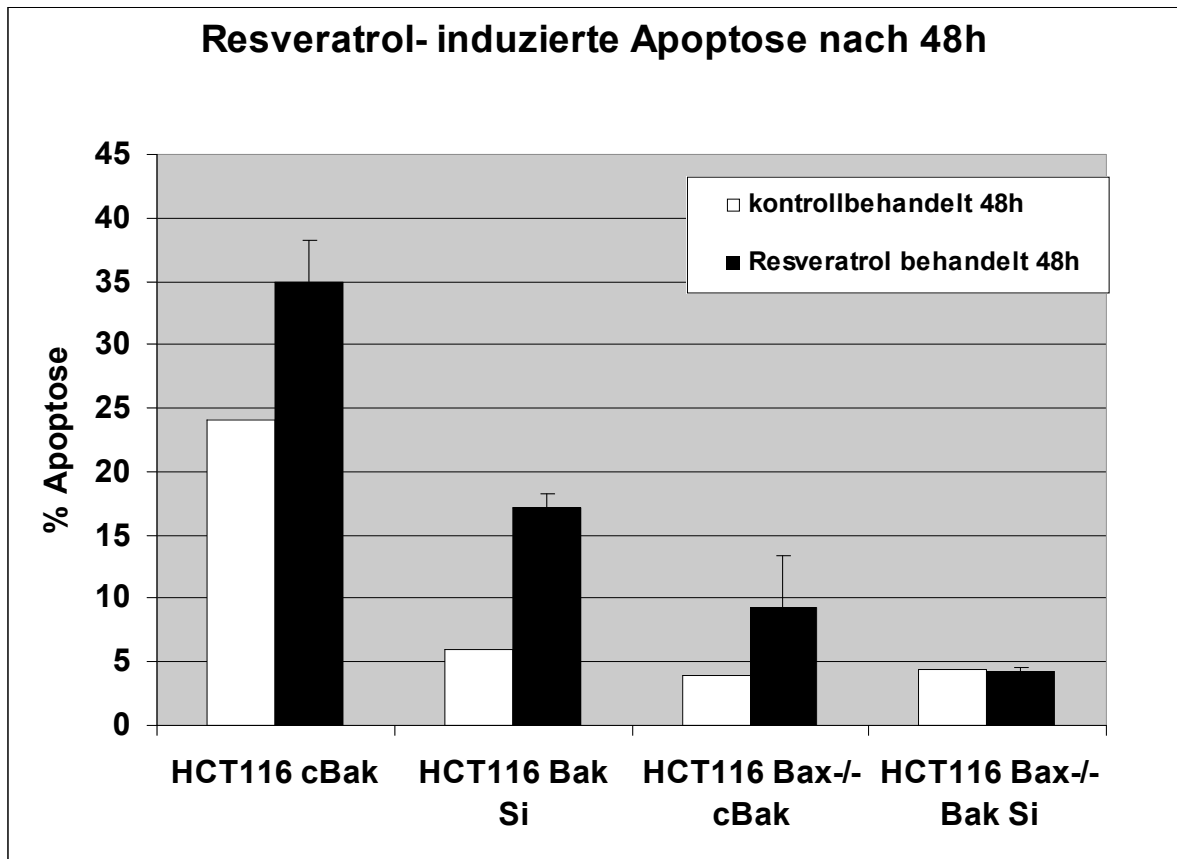


Abb. 4.31 : Wiederholung der Versuche aus Kapitel 4.8.2.1, 4.8.2.2 und 4.8.2.3. Die in den vorangegangenen Versuchen erzielten Ergebnisse konnten im Wesentlichen bestätigt werden, wenn auch die basale Apoptoserate der kontrolltransfizierten und kontrollbehandelten Zellen aus unbekanntem Gründen höher lag.

Zusammenfassend kann also geschlossen werden, dass transient transfizierte kurze interferierende RNAs (siRNA) mit Komplementarität zu den mRNAs des „multidomain proapoptotic“ BCL- 2- Proteins Bak die zellulären Level dieses Proteins reduzieren und auf diesem Wege den Effekt chemotherapeutischer oder chemopräventiver Substanzen wie Resveratrol auf das Überleben von Tumorzellen beeinflussen können. SiRNA- Technologie stellt somit ein wichtiges Werkzeug zur Aufklärung der biochemischen Pfade, die zur Chemosensitivität von Tumorzellen beitragen, dar. Vor allem aber deuten die Resultate der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Resveratrol und verwandte Substanzen äußerst vielversprechende Chemopräventiva sind. Ihre Fähigkeit zur Eliminierung von Tumorzellen durch Apoptoseinduktion geht erst nach Inaktivierung zweier Gene (bax und bak) verloren, während die heutzutage zu diesem Zweck konventionell eingesetzten NSAIDs bereits nach Verlust von bax wirkungslos werden (Zhang et al., 2000).

5 DISKUSSION

Neoplasien stellen nach den Erkrankungen des Herz- / Kreislaufapparates die zweithäufigste Todesursache dar. Eine der bedeutendsten und gefährlichsten Krebsarten sind die bösartigen Neubildungen des Dickdarmes. Im Jahr 2002 kosteten sie ca. 20500 Menschen in Deutschland das Leben (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Auch in der Tiermedizin stellen sie neben den Tumoren der Mundhöhle die häufigste Entartung des Verdauungstraktes dar, wobei es sich in über 80 % der Fälle um maligne Neubildungen handelt. Es ist also leicht ersichtlich, dass der Einsatz einer effektiven Prophylaxe vor Dickdarmkrebs mehr als wünschenswert wäre und dies gilt insbesondere für Individuen mit einem erhöhten familiären Risiko. Die konventionelle Chemoprophylaxe besteht aus dem Verabreichen von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs), wie Acetylsalicylsäure, Indomethacin, Piroxicam oder Sulindac. Diese haben neben ihrer antiinflammatorischen Wirkung auch einen Einfluss auf das Tumorgeschehen. Durch eine Verschiebung des Verhältnisses des proapoptotischen Proteins Bax zum antiapoptotischen Protein BCL- X_L zu Gunsten des Zelltodauslösers werden die entarteten Zellen in den programmierten Suizid getrieben (Zhang et al., 2000). Diese Wirkung ist jedoch nur von kurzer Dauer, da die Tumoren durch den starken Selektionsdruck, dem sie unterliegen, innerhalb kürzester Zeit das proapoptotische Bax ausschalten können (Rampino et al., 1997; Ionov et al., 2000). Dadurch werden die NSAIDs unwirksam. Eine Substanz, deren antitumorigenes Potential seit einigen Jahren bekannt ist, ist der Cyclooxygenasehemmer Resveratrol. Bei diesem Wirkstoff handelt es sich um ein Phytoalexin, welches in den verschiedensten Pflanzen vorgefunden wird. Untersuchungen der Wirkung von Resveratrol auf Kolontumorzellen ergaben, dass beim Wegfall von Bax in diesen Zellen zwar eine verminderte Apoptose nach Resveratrolbehandlung festzustellen war, diese aber nicht gänzlich zum Erliegen kam (Mahyar- Roemer et al., 2002). Die Ergebnisse implizierten das Vorhandensein weiterer pathways für die Resveratrol- induzierte Apoptose. Dabei kommt dem proapoptotischen Protein Bak eine besondere Rolle zu, da in Untersuchungen an transgenen Mäusen, welche defizient für Bak und Bax waren, beobachtet werden konnte, dass sich diese gänzlich resistent gegenüber der Schädigungs- induzierten Apoptose zeigten (Wei et al., 2001). In einer anderen Studie wurde Bak sogar eine

Schlüsselrolle in der Vermittlung der mitochondrialen Apoptose zugeordnet (Wang et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen, welchen Stellenwert Bak in der Vermittlung der Resveratrolwirkung auf menschliche Kolonkarzinomzellen einnimmt und ob, analog den Erkenntnissen des Versuches an den transgenen Mäusen, der Ausfall von Bax und Bak ein vollständiges Erliegen der Apoptose nach Resveratrolbehandlung zur Folge haben würde.

Die der Arbeit zugrunde liegende Frage war, ob Resveratrol in der Lage ist, Bak zu aktivieren, welches, wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben, mit einer Konformationsänderung am N- Terminus einhergeht, die diesen sensitiv gegenüber einem Trypsinverdau werden lässt. Die Fähigkeit, solches zu bewirken wurde bereits für mitochondriales p53 (Leu et al., 2004) und für tBID, einem aktiven BH- 3- only- Protein gezeigt (Wei et al., 2000; Wei et al., 2001). Mittels eines spezifisch gegen den N- Terminus des Bak- Proteins gerichteten Antikörpers kann dann die Menge an Bak bestimmt werden. Im Falle der vorausgegangenen Aktivierung sollte also eine reduzierte Menge an Bak zu erwarten sein, was in unseren Versuchen auch zu beobachten war. Nach der Resveratrolbehandlung von HCT116 Bax-/- Zellen wurde in der Western Blot- Analyse nach Trypsinverdau erheblich weniger Bak in diesen Zellen als in kontrollbehandelten Zellen detektiert. Diese wiederum zeigten keinen Unterschied in ihrem Gesamt- Bak- Gehalt. Daraus konnte zum einen geschlossen werden, dass Trypsin tatsächlich nur spezifisch die aktivierte, konformationsgeänderte Form von Bak proteolytisch spaltet. Zum anderen konnte damit auch gezeigt werden, dass Resveratrol, wie zuvor auch für p53 und tBID gezeigt, eine Aktivierung von Bak hervorruft.

Die nächste Frage, die sich nun in diesem Zusammenhang stellte war, ob die Aktivierung von Bak durch Resveratrol über den p53- Tumorsuppressor vermittelt wird. Frühere Untersuchungen an Bax hatten ergeben, dass das Protein sowohl in Abhängigkeit als auch unabhängig von p53 aktiviert werden kann (Mahyar-Roemer, 2001). Um dies für Bak zu untersuchen, wurde der Versuch der Resveratrolbehandlung mit anschließendem Trypsinverdau an HCT116 p53-/- Zellen durchgeführt. Prinzipiell war eine Aktivierungsfähigkeit von Bak durch p53, wie bereits erwähnt, durch die Studien der Arbeitsgruppe von Dr. Donna L. George, Pennsylvania, USA dargelegt worden (Leu et al., 2004). In unseren Untersuchungen

zeigte sich auch in Abwesenheit vom Tumorsuppressor p53 eine deutliche Aktivierung des Bak- Proteins. Um eine ungleichmäßige Beladung der Geldtaschen des Elektrophoreseregels auszuschließen wurde die aufgetragene Proteinmenge mittels Cytochromoxidase IV (CytOx IV)- Nachweis überprüft. Die Tatsache, dass alle Banden eine annähernd gleiche Menge an CytOx IV aufwiesen, zeigte, dass die Taschen jeweils gleichmäßig beladen worden waren.

Das Fazit dieser Untersuchungen lautete also, dass das proapoptotische Bak-Protein durch Resveratrol aktiviert werden kann und dass diese Aktivierung sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von p53 geschehen kann. Dieser Umstand erlangt insbesondere dadurch Wichtigkeit, dass es vermutlich kaum eine Neoplasie gibt, in der die proapoptotische Wildtyp- Variante von p53 funktionell ist (Roemer, 1999; Hollstein, 1991; Levine, 1991). Jedes potentielle Chemopräventivum, welches unabhängig von p53 zu wirken vermag, ist demnach im Vorteil.

Auch zahlreiche andere Untersuchungen hatten bereits darauf hingewiesen, dass Resveratrol und verwandte Substanzen den intrinsischen, mitochondrialen Zelltod-pathway auslösen können.

Eine Induktion der Apoptose in humanen Leukämie- Zellen durch Heyneanol A, einem Tetramer von Resveratrol, resultierte in der Freisetzung von Cytochrom c (Lee et al., 2004) und auch die Oligomerisierung von Bak durch tBID rief eine solche Freisetzung von Cytochrom c hervor (Wei et al., 2000).

In unseren weiteren Untersuchungen wurde deshalb zunächst geschaut, ob sich die Induktion von Bak durch Resveratrol in oben beschriebener Weise auswirkt, nämlich in einer Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Für diese Untersuchungen wurden wiederum HCT116 Bax^{-/-} Zellen eingesetzt, da eine Freisetzung von Cytochrom c sowohl durch die Wirkung von aktiviertem Bak als auch von aktiviertem Bax, und zwar unabhängig voneinander, hätte erfolgen können (Degenhardt et al., 2002).

Während in kontrollbehandelten Zellen über den gesamten Zeitraum und in Resveratrol- behandelten Zellen nach 4 und 8 Stunden kaum Cytochrom c in der zytoplasmatischen Proteinfraction nachweisbar war, hatte eine Behandlung der Zellen mit 100 µM Resveratrol für 12 und 24 Stunden eine deutliche Freisetzung von Cytochrom c zur Folge. Dies zeigte, dass sich die beiden proapoptotischen BCL- 2- Proteine Bak und Bax komplementieren können. Die Beobachtung der Arbeitsgruppe von Dr. Richard Greil, Innsbruck, Österreich, dass eine Resveratrolbehandlung von

entarteten T- Zellen nicht in einer Freisetzung von Cytochrom c mündet (Tinhofer et al., 2001), konnte zumindest für Kolontumorzellen der Zelllinie HCT116 somit nicht bestätigt werden.

Die Analyse des weiteren Signalwegs der Bak- abhängigen Apoptose ergab, dass die Cytochrom c Freisetzung eine Aktivierung der Initiatorcaspase- 9 nach sich zog, eine Beobachtung, die sich ebenfalls nach 12 und nach 24 Stunden der Resveratrolbehandlung manifestierte und die, trotz der abweichenden Ergebnisse über die Cytochrom c Freisetzung, auch bei den Untersuchungen der AG Greil an T- Zellen gemacht wurde (Tinhofer et al., 2001).

Bemerkenswerterweise war zwar in den HCT116 Bax-/- Zellen nach 12 Stunden ein Anstieg an aktivierter Caspase- 9 festzustellen, nach 24 Stunden aber immer noch keine Aktivität der Effektorcaspase- 3, während dies in den Bax- haltigen Zellen beobachtet worden war (Mahyar- Roemer et al., 2002).

Es könnte sich bei der Aktivierung der Caspase- 3 um einen zeitlich auf ein enges Fenster begrenzten Prozess handeln, der in unserer Zeitverlaufs- Untersuchung nicht erfasst worden ist.

Möglich wäre auch eine relativ späte Rekrutierung der Caspase nach über 24 Stunden, so wie dies in einigen vorangegangenen Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe der Fall war, in denen ein Anstieg der aktiven Form der Caspase- 3 erst nach 36 Stunden festgestellt wurde (Mahyar- Roemer et al., 2002).

Andererseits könnten statt der Effektorcaspase- 3 andere Effektorcaspasen für Vermittlung des Zelltodsignals verantwortlich sein bzw. neben der Inanspruchnahme der Caspase- 9 auch andere Initiatorcaspasen durch eine Resveratrol- induzierte Bak- Aktivierung rekrutiert werden. Der Caspase- 2, die sowohl die Rolle einer Initiator- als auch die einer Effektorcaspase übernehmen kann, könnte dabei eine wichtige Rolle zukommen, wie einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Strasser, Melbourne, Australien zu entnehmen ist (Marsden et al., 2004).

Diese Studie zeigte, dass eine Cytochrom c Freisetzung auch unabhängig von der Aktivierung der Caspase- 9 und - 2 erfolgen kann (Marsden et al., 2004). Auch eine vollständige Unabhängigkeit von Caspase- 9 und - 3 der durch Pflanzenwirkstoffe hervorgerufenen mitochondrialen Apoptose wurde ebenfalls beschrieben (Diaz et al., 2003).

Da unsere Beobachtungen über die Caspasen- Abhängigkeit des Bak- vermittelten, Resveratrol- induzierten Apoptosewegs keine eindeutige Aussage über die Identität

der Effektorcaspase downstream von Caspase- 9 zuließen, betrachteten wir auch die Möglichkeiten einer Caspasen- unabhängigen mitochondrialen Apoptose.

In diesem Zusammenhang erschien die Freisetzung des „Apoptosis- Inducing Factor“ AIF aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien als eine der wahrscheinlichsten Alternativen. Es existieren unterschiedliche Ansichten darüber, ob die Vermittlung des Effekts von AIF die Caspasenaktivierung benötigt, und wenn dem so ist, welche Caspasen dann die entsprechende Schlüsselrolle übernehmen. So impliziert eine Studie der Arbeitsgruppe von Dr. Richard Youle, dass eine durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials hervorgerufene Freisetzung von AIF zwingend das Vorhandensein von Caspasen zur Ausübung der Apoptoseinduktion benötigt (Arnoult et al., 2003). Andere Arbeiten deuten an, dass die AIF- Freisetzung auch unabhängig von Caspasen erfolgen kann (Kang et al., 2004).

Die Entlassung von AIF aus dem mitochondrialen Intermembranspalt und die anschließende Apoptose ohne Freisetzung von Cytochrom c nach Behandlung von HCT116 Kolontumorzellen mit Chlorophyllin konnte von der Arbeitsgruppe Dr. Roderick Dashwood, Corvallis, Oregon, USA nachgewiesen werden. Statt des üblichen Cytochrom c \Rightarrow Caspase- 9 \Rightarrow Caspase- 3 \Rightarrow PARP- Signalwegs wurde in dieser Studie die AIF- induzierte Aktivierung der Caspase- 8 und Caspase- 6 beobachtet (Diaz et al., 2003).

Ähnlich wie auch die Cytochrom c Freisetzung konnte in unseren Untersuchungen nach 12 und 24 Stunden tatsächlich eine Steigerung der Menge an AIF in der zytoplasmatischen Proteinfraction detektiert werden. Dies könnte, in Zusammenhang mit der nicht vorhandenen Caspase- 3 Aktivitätssteigerung, ein Anzeichen dafür sein, dass die Aktivierung von Bak nicht zwangsläufig eine Rekrutierung des Cytochrom c \Rightarrow Caspase- 9 \Rightarrow Caspase- 3 \Rightarrow PARP- Signalwegs zur Folge haben muss, um ihre tödliche Wirkung zu entfalten. Die von uns beobachtete Freisetzung von AIF nach Resveratrolbehandlung von Kolontumorzellen konnte wiederum die Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Dr. Richard Greil einer Freisetzung in entarteten T- Zellen nach Resveratrolbehandlung nicht bestätigen (Tinhofer et al., 2001). Hierbei handelt es sich vermutlich um zelltypspezifische Effekte.

Es mag zunächst widersinnig erscheinen, sich im Falle einer Caspasen- unabhängigen Apoptose die Freisetzung der mitochondrialen Proteine HtrA2/Omi anzuschauen, da diese als Inhibitoren der IAPs natürlich auf die Caspasen- Tätigkeit einwirken (Seong et al., 2004). Es ist aber bekannt, dass HtrA2/Omi eine

Serinproteasen- Aktivität besitzen, die sie auch zu einer Caspasen- unabhängigen Einleitung der Apoptose befähigt (Hegde et al., 2002). Als mitochondriales Protein stellt HtrA2/Omi einen der weiteren Effektoren einer mitochondrialen Apoptose dar (Lucken- Ardjomande und Martinou, 2005).

Auch für HtrA2/Omi galt das für Cytochrom c und AIF beschriebene Ergebnis, nämlich eine feststellbare Erhöhung der Proteinmenge im Zytoplasma nach 12 bzw. 24 Stunden der Resveratrolbehandlung. Neben einer selektiven Ausschleusung dieser Effektoren durch die von oligomerisiertem Bak erzeugten Poren kann aber auch, wie im Falle von AIF, ein genereller Zusammenbruch des Membranpotentials der Mitochondrien der Grund für die beobachtete Freisetzung von HtrA2/Omi ins Zytoplasma sein.

Zusammenfassend kann also geschlossen werden, dass Resveratrol selbst in Abwesenheit des in Kolontumorzellen oftmals verloren gegangenen Bax über die Aktivierung von Bak den intrinsischen, mitochondrialen Apoptoseweg aktivieren kann. Der Ausfall beider Proteine führt zur weitgehenden Apoptoseresistenz !

Da trotz Modifikationen in der Transfektionsmethode keine zufriedenstellenden Ergebnisse bei der Erzeugung stabiler Bak- defizienter Zelllinien mittels pSUPER Vektor erzielt werden konnten, gilt es, mögliche Fehlerquellen zu diskutieren. Zunächst konnte mittels Vektor- vermittelter Überexpression des gewünschten Bak- Proteins der geeignete Primärantikörper bestimmt werden. Auch die Transfektionseffizienz der eingesetzten Zelllinien erwies sich als hinreichend. Im Plasmidverdau konnte außerdem nachgewiesen werden, dass das korrekte Insert tatsächlich in das Plasmid eingefügt worden war.

Trotzdem konnte nach erstem Augenschein in den stabilen Zelllinien nur eine geringe Reduktion des Gehaltes an Bak erreicht werden. Und auch diese geringe Reduktion war nicht von langer Dauer, so dass es fraglich erscheint, ob überhaupt jemals eine signifikante Reduktion des Proteins mittels pSUPER- Vektor erreicht worden war.

Zum Ausschluss weiterer Fehlerquellen bliebe z.B. eine Sequenzierung des Inserts, um zu sehen, ob es sich bei der eingefügten Sequenz um die angestrebte Nukleotidabfolge handelt. Fehler bei der DNA- Synthese werden auch vom Hersteller der Sequenzen nicht ausgeschlossen. Auch eine Mutation, welche an einem

beliebigen Punkt des Einsatzes des pSUPER Vektors auftreten kann, kann letztendlich zum Funktionsausfall des Transkriptes führen.

Der wahrscheinlichste Grund für die Fehlfunktion unseres pSUPER Vektors ist jedoch die Wahl einer ungeeigneten Zielsequenz zur Ausschaltung des Bak-Proteins. Dieses Problem stellt auch nach Herstellerangaben des inzwischen käuflich zu erwerbenden Vektors eines der Hauptprobleme dar. Als nächster Schritt im Rahmen dieses Projektes wäre also die Erprobung einer anderen Zielsequenz angeraten, da die äußeren Rahmenbedingungen, wie korrekte Antikörper und Transfektionsraten, stimmten.

Weitaus vielversprechender und erfolgreicher waren die Versuche, in denen die künstlich erzeugte siRNA zum Einsatz kam, die zuvor erfolgreich zu einer Reduktion von Bak in HCT116- Zellen eingesetzt worden war (Wang und El- Deiry, 2003). Nach zeit- und arbeitsintensiven Vorarbeiten konnten die Bedingungen soweit optimiert werden, dass die RNA- Interferenz auf siRNA Basis zu einer deutlichen Reduktion von Bak in den transfizierten Zellen führte. Transfektionseffizienzen von ca. 85 – 95 %, die nach wie vor bei Anwendung des erarbeiteten Protokolls erreicht werden, waren die Grundvoraussetzung für die Reduktion des Proteins. Nachdem die Voraussetzungen zur Erzeugung Bak- defizienter Derivate der HCT116 und HCT116 Bax-/- Zellen geschaffen worden waren, konnte die Rolle von Bak in der Resveratrol-induzierten Kolontumorzellapoptose genauer analysiert werden.

Hierbei konnte zunächst die vorausgegangene Beobachtung unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, dass ein Ausfall von Bax die Apoptoserate nach Resveratrolbehandlung zwar verringert, sie aber nicht gänzlich aufzuheben vermag und dass Bax eine Schlüsselrolle in der mitochondrialen Apoptose durch Resveratrol einnimmt (Mahyar- Roemer et al., 2002).

Eine der neuen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit war, dass die Apoptoserate nach Wegfall von Bak, jedoch bei Anwesenheit von Bax in ähnlichem Maße verringert war, wie im umgekehrten Fall. Dies impliziert eine Gleichwertigkeit der beiden proapoptotischen Proteine in der Vermittlung des Resveratrol- bewirkten Zelltodes. Die Untersuchungen bestätigten die Beobachtung der Arbeitsgruppe von Dr. Eileen White, Howard Hughes Medical Institute, USA, welche eine Unabhängigkeit von Bak und Bax in der Vermittlung der mitochondrialen Apoptose aufzeigten (Degenhardt et al., 2002).

Die Beobachtung, dass diese Gleichwertigkeit 24 und 48 Stunden nach Resveratrolbehandlung zu erkennen ist, jedoch nicht mehr nach 72 Stunden, geht mit dem im Zeitverlauf gesehenen Gehalt an Bak nach siRNA Transfektion einher und zeigt in eindrucksvoller Weise, dass der Unterschied in der Apoptose tatsächlich auf den unterschiedlichen Bak- Gehalt zurückzuführen ist. So, wie sich die Menge an Bak der kontrolltransfizierten und der Bak- siRNA transfizierten Zellen nach mehreren Tagen wieder annähern, so ähneln sich auch die Apoptoseraten.

Untersuchungen an transgenen Mäusen haben gezeigt, dass ein Verlust beider Proteine zur vollständigen Resistenz gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen apoptoseauslösenden Noxen führt (Wei et al., 2001; Degenhardt et al., 2002).

Siedelt man den Bereich der basalen Apoptose zwischen 1 und 5 % an, so erlaubt dies die Schlussfolgerung, dass Bax und Bak die beiden einzigen Proteine sind, über die Resveratrol in HCT116 Kolonkarzinomzellen eine mitochondriale Apoptose auszulösen vermag, da in den Bak- und Bax- defizienten Zellen HCT116 Bax-/- BakSi die Apoptoserate nach Resveratrolbehandlung unter 5 % lag.

Wertete man den Anstieg der Apoptoserate in HCT116 Bax-/- BakSi Zellen nach 24 Stunden von 1,5 auf 3 % bzw. nach 48 Stunden von 1 % auf 4 % jedoch als eine Wirkstoff- induzierte Steigerung, so bliebe z. B. die Vermutung, dass ein solcher Anstieg auf das verbleibende, wenn auch ersichtlich unbedeutendere proapoptotische BCL- 2- Protein Bok zurückzuführen sein könnte. Allerdings wurde Bok in bisherigen Beobachtungen (s. Kapitel 1.3.3) lediglich in Zellen des Fortpflanzungstraktes vorgefunden (Cory und Adams, 2002).

Auch eine Beteiligung des Todesrezeptorweges bei der Resveratrol- induzierten Apoptose ist unwahrscheinlich. Diese Theorie wurde zwar immer wieder aufgestellt (Clement et al., 1998), aber durch andere Forschungsarbeiten immer wieder in Frage gestellt (Wieder et al., 2001; Bernhard et al., 2000). Eine in dieser Hinsicht wichtige Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe Solary erstellt (Delmas et al., 2004). In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass es unter der Einwirkung von Resveratrol auf diverse Zelllinien zu einer Reorganisation in Form einer lokalen Konzentrierung der TRAIL- (TNF- Related Apoptosis- Inducing Ligand) Rezeptoren an der Zelloberfläche kommt. Eine solche Zusammenlagerung von Rezeptoren (=„lipid rafts“) erhöht die Sensitivität für deren Ligand. Die unterschiedlichen Zelltypen wiesen aber eine höchst unterschiedliche Ansprechbarkeit für Resveratrol auf. Im Falle der HCT Zellen

fürhte die Behandlung mit RSV zwar zu einer Zusammenlagerung der TRAIL-Rezeptoren, diese müssen aber dann wiederum durch einen passenden Liganden aktiviert werden. Eine Involvierung der Todesrezeptoren in die Induktion von Apoptose durch Resveratrol in HCT116 Zellen ist also unwahrscheinlich. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Resveratrol gegenüber der bisherigen Chemoprävention mittels NSAIDs eine ernstzunehmende Alternative in der Darmkrebsprophylaxe darstellt. Im Gegensatz zu den NSAIDs, die durch einen Wegfall von Bax in sehr frühen Stadien der Kolontumorzellgenese rasch unwirksam werden (Zhang et al., 2000; Rampino et al., 1997; Ionov et al., 2000) (und von denen einige wegen Toxizität vom Markt genommen werden mussten (VIOXX)), hält die antitumorigene Wirkung des nicht-toxischen Resveratrols (Jang et al., 1997) durch den erst relativ späten Ausfall von Bak in entarteten gastrointestinalen Zellen (Kondo et al., 2000) und die Komplementarität von Bax und Bak länger an.

Die Einfachheit des Einsatzes von Resveratrol ist dadurch gewährleistet, dass der in Pflanzen enthaltene Wirkstoff durch die alltägliche Nahrung in Form eines Lebensmittel- oder Futtermitteladditives aufgenommen werden kann, so dass die erforderliche proapoptotische Konzentration von 100 μM im Darm konstant erreicht werden kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Kolorektale Tumoren gehören zu den lebensbedrohlichsten Neoplasien in der Tier- und Humanmedizin. Die konventionelle Chemoprävention sieht den Einsatz von Nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) vor, welche die Induktion der mitochondrialen Apoptose über die Veränderung des Verhältnisses vom proapoptotischen BCL- 2- Protein Bax zum antiapoptotischen BCL- 2- Protein BCL- X_L bewirken. Die Effizienz der NSAIDs wird dadurch limitiert, dass es im Laufe der Entstehung maligner Geschwulste durch Mutationen zur raschen Inaktivierung von Bax kommt.

Eine vielversprechende Alternative stellt der Einsatz von Resveratrol, einem Phytoalexin, dar. Versuche an Bax- defizienten Kolontumorzellen haben bewiesen, dass die Apoptose- induzierende Wirkung von Resveratrol durch den Ausfall von Bax zwar gehemmt, nicht aber, wie im Fall der bislang untersuchten anderen NSAIDs, gänzlich ausgeschaltet wird. Diese Beobachtung implizierte das Vorhandensein weiterer Effektoren von Resveratrol, die mit großer Wahrscheinlichkeit unter den anderen proapoptotischen BCL- 2- Proteinen zu suchen sein würden. Ein möglicher Kandidat war das dem Bax homologe Bak- Protein, da an transgenen Mäusen, welche defizient für Bax und Bak waren, die mitochondriale Apoptose nach Applikation diverser Stimuli gänzlich zum Erliegen kam.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Resveratrol in der Lage ist, Bak zu aktivieren. Dies führte zu einer Oligomerisierung des Proteins und dadurch zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen Zelltod- Effektoren aus den Mitochondrien. Die Aktivierung des mitochondrialen Zelltodweges erfolgte in Anwesenheit, aber auch unabhängig von p53.

Mittels siRNA- Technik konnten Derivate der Zelllinien HCT116 und HCT116 Bax-/- erzeugt werden, welche eine weitestgehende transiente Defizienz von Bak aufwiesen. Eine vergleichende Behandlung der im Bax- und Bak- Gehalt unterschiedlichen Zelltypen ergab, dass die Wirkung von Resveratrol in annähernd gleichem Maße von Bax und Bak vermittelt werden kann, und dass ein Ausfall beider Proteine in einer vollständigen Insensitivität der HCT116- Kolontumorzellen gegenüber einer Resveratrol- induzierten Apoptose mündet. Die Sensitivität von Kolontumoren gegen Resveratrol könnte generell also von der Anwesenheit von Bax und Bak abhängen.

7 SUMMARY

Colorectal tumours are amongst the most life-threatening neoplasia in man and small companion animals. The current chemoprevention relies on the application of “Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs” (NSAIDs) which induce mitochondrial apoptosis by altering the ratio of the proapoptotic BCL-2 protein Bax to the antiapoptotic BCL-2 protein Bcl-X_L. However, the effectiveness of the NSAIDs is limited by the rapid inactivation of Bax due to mutations in the early stages of arising malignant tumours.

The use of Resveratrol (RSV), a phytoalexin, constitutes a promising alternative. Examinations on the treatment of Bax-deficient colon tumour cells with RSV showed a decreased but – unlike the treatment with NSAIDs – not completely abolished rate of apoptosis.

These findings suggested the presence of further effectors of RSV which were likely to be found among the remaining proapoptotic BCL-2 proteins. One possible candidate was the Bax homologue Bak, since the application of multiple mitochondrial apoptosis inducing stimuli showed no effect in Bax and Bak deficient transgenic mice.

In the present study we were able to show that RSV was capable of activating Bak thus leading to an oligomerization of the protein and thereby causing the release of cytochrome c and other death effectors from the mitochondria. The recruitment of the mitochondrial apoptotic pathway occurred in the presence but also independently of p53.

Using siRNA techniques we were able to create Bak deficient derivatives of HCT116 and HCT116 Bax^{-/-} cells. The analysis of a RSV treatment of such cells with differences in their Bax and/or Bak content showed that the effects of RSV could be mediated almost equally by Bax and Bak and that a loss of both proteins resulted in a complete insensibility of HCT116 cells to a RSV induced apoptosis. The response of colon tumours to Resveratrol might therefore be generally dependent on the presence of Bax and Bak.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. M., and Cory, S.** (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**(5381), 1322-6.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J.** (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**(2), 171.
- Antonsson, B.** (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* **306**(3), 347-61.
- Aravind, L., Dixit, V. M., and Koonin, E. V.** (1999). The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* **24**(2), 47-53.
- Arends, M. J., and Wyllie, A. H.** (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* **32**, 223-54.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F., and Youle, R. J.** (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* **22**(17), 4385-99.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M.** (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2), 255-60.
- Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L., and Korsmeyer, S. J.** (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**(3), 899-906.
- Bernhard, D., Tinhofer, I., Tonko, M., Hubl, H., Ausserlechner, M. J., Greil, R., Kofler, R., and Csordas, A.** (2000). Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell Death Differ* **7**(9), 834-42.

- Bhat, K. P., and Pezzuto, J. M.** (2002). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* **957**, 210-29.
- Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Kontgen, F., Adams, J. M., and Strasser, A.** (1999). Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**(5445), 1735-8.
- Bouillet, P., and Strasser, A.** (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**(Pt 8), 1567-74.
- Braun, M. Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and 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**(2), 657-61.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R.** (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**(5567), 550-3.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X.** (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 269-90.
- Campisi, J., Kim, S. H., Lim, C. S., and Rubio, M.** (2001). Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol* **36**(10), 1619-37.
- Chan, S. L., and Yu, V. C.** (2004). Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**(3), 119-28.

- Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Hardwick, J. M.** (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* **379**(6565), 554-6.
- Cheng, E. H., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J., and Korsmeyer, S. J.** (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**(5632), 513-7.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J.** (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**(3), 705-11.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., and David, C. N.** (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* **9**(17), 959-62.
- Cleary, M. L., and Sklar, J.** (1985). Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(21), 7439-43.
- Clement, M. V., Hirpara, J. L., Chawdhury, S. H., and Pervaiz, S.** (1998). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* **92**(3), 996-1002.
- Cory, S., and Adams, J. M.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**(9), 647-56.
- Crowell, J. A., Korytko, P. J., Morrissey, R. L., Booth, T. D., and Levine, B. S.** (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* **82**(2), 614-9.
- Cryns, V., and Yuan, J.** (1998). Proteases to die for. *Genes Dev* **12**(11), 1551-70.

- Degenhardt, K., Sundararajan, R., Lindsten, T., Thompson, C., and White, E.** (2002). Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. *J Biol Chem* **277**(16), 14127-34.
- Delmas, D., Rebe, C., Micheau, O., Athias, A., Gambert, P., Grazide, S., Laurent, G., Latruffe, N., and Solary, E.** (2004). Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* **23**(55), 8979-86.
- Desagher, S., and Martinou, J. C.** (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**(9), 369-77.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C.** (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**(6639), 300-4.
- Diaz, G. D., Li, Q., and Dashwood, R. H.** (2003). Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res* **63**(6), 1254-61.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al.** (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20), 9363-7.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A.** (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**(6366), 215-21.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**(1), 33-42.

- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T.** (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**(2), 188-200.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S.** (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**(6662), 43-50.
- Ferri, K. F., and Kroemer, G.** (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**(11), E255-63.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669), 806-11.
- Fracchiolla, N. S., Capaccio, P., Carboni, N., Pagliari, A. V., Neri, A., Ronchetti, D., Pruner, G., Silvotti, M. G., Pignataro, L., Buffa, R., and Broich, G.** (1999). Immunohistochemical and molecular analysis of bax, bcl-2 and p53 genes in laryngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* **19**(2A), 1043-51.
- Gescher, A. J., and Steward, W. P.** (2003). Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**(10), 953-7.
- Gilmore, A. P., Metcalfe, A. D., Romer, L. H., and Streuli, C. H.** (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* **149**(2), 431-46.
- Gonczy, P.** (2002). Nuclear envelope: torn apart at mitosis. *Curr Biol* **12**(7), R242-4.

- Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E., and Babior, B. M.** (1996). Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2), 654-8.
- Griffiths, G. J., Corfe, B. M., Savory, P., Leech, S., Esposti, M. D., Hickman, J. A., and Dive, C.** (2001). Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak. *Oncogene* **20**(52), 7668-76.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C., and Hickman, J. A.** (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**(5), 903-14.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J.** (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* **17**(14), 3878-85.
- Häcki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I., and Borner, C.** (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* **19**(19), 2286-95.
- Hattori, R., Otani, H., Maulik, N., and Das, D. K.** (2002). Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(6), H1988-95.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S.** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S.** (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**(1), 432-8.

- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., and Korsmeyer, S. J.** (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**(6299), 334-6.
- Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J.** (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**(2), 241-51.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C.** (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**(5015), 49-53.
- Huang, C., Ma, W. Y., Goranson, A., and Dong, Z.** (1999). Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* **20**(2), 237-42.
- Huang, W. P., and Klionsky, D. J.** (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct* **27**(6), 409-20.
- Hung, L. M., Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., and Su, M. J.** (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* **47**(3), 549-55.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R. J., and Robertson, H. D.** (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* **250**(2), 409-17.
- Inohara, N., and Nunez, G.** (2000). Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ* **7**(5), 509-10.
- Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J. C., and Perucho, M.** (2000). Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20), 10872-7.

- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzuto, J. M.** (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**(5297), 218-20.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zuniga-Pflucker, J. C., Kroemer, G., and Penninger, J. M.** (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**(6828), 549-54.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J. C.** (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9), 4997-5002.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H.** (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**(6475), 31-7.
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., and Golstein, P.** (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**(5171), 528-30.
- Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., and Bredesen, D. E.** (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**(5137), 1274-7.

- Kang, Y. H., Yi, M. J., Kim, M. J., Park, M. T., Bae, S., Kang, C. M., Cho, C. K., Park, I. C., Park, M. J., Rhee, C. H., Hong, S. I., Chung, H. Y., Lee, Y. S., and Lee, S. J.** (2004). Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res* **64**(24), 8960-7.
- Karsenti, D., Bacq, Y., Brechot, J. F., Mariotte, N., Vol, S., and Tichet, J.** (2001). Serum amylase and lipase activities in normal pregnancy: a prospective case-control study. *Am J Gastroenterol* **96**(3), 697-9.
- Kaufman, R. J.** (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**(10), 1211-33.
- Kaufmann, S. H., and Hengartner, M. O.** (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* **11**(12), 526-34.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., and Harmon, B. V.** (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**(8), 2013-26.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4), 239-57.
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T.** (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* **282**(5388), 487-90.
- Knudson, C. M., and Korsmeyer, S. J.** (1997). Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* **16**(4), 358-63.

- Kondo, S., Shinomura, Y., Miyazaki, Y., Kiyohara, T., Tsutsui, S., Kitamura, S., Nagasawa, Y., Nakahara, M., Kanayama, S., and Matsuzawa, Y.** (2000). Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* **60**(16), 4328-30.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., and Williams, L. T.** (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**(5336), 294-8.
- Krammer, P. H.** (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**(6805), 789-95.
- Kroemer, G.** (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* **3**(6), 614-20.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A.** (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**(1), 44-51.
- Lane, D. P., and Crawford, L. V.** (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**(5701), 261-3.
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C.** (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**(6495), 346-7.
- Lee, E. O., Kwon, B. M., Song, G. Y., Chae, C. H., Kim, H. M., Shim, I. S., Ahn, K. S., and Kim, S. H.** (2004). Heyneanol A induces apoptosis via cytochrome c release and caspase activation in human leukemic U937 cells. *Life Sci* **74**(18), 2313-26.

- Lee, S. T., Hoeflich, K. P., Wasfy, G. W., Woodgett, J. R., Leber, B., Andrews, D. W., Hedley, D. W., and Penn, L. Z.** (1999). Bcl-2 targeted to the endoplasmic reticulum can inhibit apoptosis induced by Myc but not etoposide in Rat-1 fibroblasts. *Oncogene* **18**(23), 3520-8.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., and George, D. L.** (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* **6**(5), 443-50.
- Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A.** (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**(6326), 453-6.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J.** (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**(4), 491-501.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X.** (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**(6842), 95-9.
- Linzer, D. I., and Levine, A. J.** (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**(1), 43-52.
- Lucken-Ardjomande, S., and Martinou, J. C.** (2005). Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization. *J Cell Sci* **118**(Pt 3), 473-83.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and 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**(4), 481-90.
- Mahyar-Roemer, M., Katsen, A., Mestres, P., and Roemer, K.** (2001). Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int J Cancer* **94**(5), 615-22.

-
- Mahyar-Roemer, M., Kohler, H., and Roemer, K.** (2002). Role of Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *BMC Cancer* **2**(1), 27.
- Malkin, D., and Friend, S. H.** (1993). Correction: a Li-Fraumeni syndrome p53 mutation. *Science* **259**(5097), 878.
- Marchenko, N. D., Zaika, A., and Moll, U. M.** (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **275**(21), 16202-12.
- Marsden, V. S., Ekert, P. G., Van Delft, M., Vaux, D. L., Adams, J. M., and Strasser, A.** (2004). Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol* **165**(6), 775-80.
- Martin, A. R., Villegas, I., La Casa, C., and de la Lastra, C. A.** (2004). Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* **67**(7), 1399-410.
- Martinou, I., Desagher, S., Eskes, R., Antonsson, B., Andre, E., Fakan, S., and Martinou, J. C.** (1999). The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol* **144**(5), 883-9.
- Martinou, J. C., and Green, D. R.** (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1), 63-7.
- Mayer, A., Neupert, W., and Lill, R.** (1995). Translocation of apocytochrome c across the outer membrane of mitochondria. *J Biol Chem* **270**(21), 12390-7.

- McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J. P., and Korsmeyer, S. J.** (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**(1), 79-88.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G.** (2000). Apoptosis in development. *Nature* **407**(6805), 796-801.
- Meisenholder, G. W., Martin, S. J., Green, D. R., Nordberg, J., Babior, B. M., and Gottlieb, R. A.** (1996). Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *J Biol Chem* **271**(27), 16260-2.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M.** (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**(3), 577-90.
- Miller, N. J., and Rice-Evans, C. A.** (1995). Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin Chem* **41**(12 Pt 1), 1789.
- Milligan, C. E., and Schwartz, L. M.** (1997). Programmed cell death during animal development. *Br Med Bull* **53**(3), 570-90.
- Murphy, K. M., Ranganathan, V., Farnsworth, M. L., Kavallaris, M., and Lock, R. B.** (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* **7**(1), 102-11.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M.** (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* **85**(6), 817-27.
- Nakano, K., and Vousden, K. H.** (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3), 683-94.

- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W.** (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**(6), 703-16.
- Nolte, I., Nolte, M.**, (2002). Praxis der Onkologie bei Hund und Katze. Enke Verlag, Stuttgart.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N.** (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**(5468), 1053-8.
- Okada, H., and Mak, T. W.** (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* **4**(8), 592-603.
- Olas, B., Wachowicz, B., Saluk-Juszczak, J., Zielinski, T., Kaca, W., and Buczynski, A.** (2001). Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin-stimulated blood platelets. *Cell Biol Toxicol* **17**(2), 117-25.
- Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J.** (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* **79**(2), 189-92.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**(4), 609-19.
- Opferman, J. T., and Korsmeyer, S. J.** (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* **4**(5), 410-5.
- Orsini, F., Pelizzoni, F., Verotta, L., Aburjai, T., and Rogers, C. B.** (1997). Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O-beta-D-glucopyranoside and related compounds. *J Nat Prod* **60**(11), 1082-7.

- Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J., and Dixit, V. M.** (1996). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* **271**(28), 16443-6.
- Peitsch, M. C., Mannherz, H. G., and Tschopp, J.** (1994). The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol* **4**(2), 37-41.
- Ragione, F. D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V. D., Racioppi, L., Soldati, G., Manna, C., Galletti, P., and Zappia, V.** (1998). Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* **250**(1), 53-8.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Perucho, M.** (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**(5302), 967-9.
- Reed, J. C.** (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* **17**(9), 2941-53.
- Reggiori, F., and Klionsky, D. J.** (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* **1**(1), 11-21.
- Rheaume, E., Cohen, L. Y., Uhlmann, F., Lazure, C., Alam, A., Hurwitz, J., Sekaly, R. P., and Denis, F.** (1997). The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *Embo J* **16**(21), 6346-54.
- Roemer, K.** (1999). Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* **380**(7-8), 879-87.
- Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotillo, D., de Gaetano, G., Evangelista, V., and Cerletti, C.** (1998). Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* **123**(8), 1691-9.

- Rudel, T., and Bokoch, G. M.** (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* **276**(5318), 1571-4.
- Russell, P., and Nurse, P.** (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**(1), 145-53.
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N. D., and Moll, U. M.** (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett* **488**(3), 110-5.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., and Fesik, S. W.** (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**(5302), 983-6.
- Schendel, S. L., Montal, M., and Reed, J. C.** (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ* **5**(5), 372-80.
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S. J.** (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**(5616), 135-9.
- Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J.** (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17), 7834-8.
- Seong, Y. M., Choi, J. Y., Park, H. J., Kim, K. J., Ahn, S. G., Seong, G. H., Kim, I. K., Kang, S., and Rhim, H.** (2004). Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *J Biol Chem* **279**(36), 37588-96.

- Sharma, S., Stutzman, J. D., Kelloff, G. J., and Steele, V. E.** (1994). Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res* **54**(22), 5848-55.
- Shi, Y.** (2002). A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ* **9**(2), 93-5.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y.** (1998). Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4), 1455-9.
- Sinicrope, F. A., and Gill, S.** (2004). Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**(1-2), 63-75.
- Song, Q., Lees-Miller, S. P., Kumar, S., Zhang, Z., Chan, D. W., Smith, G. C., Jackson, S. P., Alnemri, E. S., Litwack, G., Khanna, K. K., and Lavin, M. F.** (1996). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *Embo J* **15**(13), 3238-46.
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A., and Salvesen, G. S.** (2002). Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* **27**(2), 94-101.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M.** (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**, 217-45.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G.** (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718), 441-6.

- Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N.** (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**(4), 645-54.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R.** (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**(3), 613-21.
- Takahashi, A., Alnemri, E. S., Lazebnik, Y. A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C.** (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16), 8395-400.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y.** (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**(5381), 1312-6.
- Tinhofer, I., Bernhard, D., Senfter, M., Anether, G., Loeffler, M., Kroemer, G., Kofler, R., Csordas, A., and Greil, R.** (2001). Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *Faseb J* **15**(9), 1613-5.
- Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K.** (1999). Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* **126**(3), 673-80.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M.** (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **229**(4720), 1390-3.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B.** (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **91**(5), 627-37.

- Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M.** (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**(6189), 440-2.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L.** (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**(1), 43-53.
- Virchow, R.** (1871). Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische Gewebelehre. 4. Auflage. Hirschwald, Berlin.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J.** (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**(6810), 307-10.
- Vousden, K. H.** (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* **1602**(1), 47-59.
- Wadsworth, T. L., and Koop, D. R.** (1999). Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol* **57**(8), 941-9.
- Wang, G., Barrett, J. W., Nazarian, S. H., Everett, H., Gao, X., Bleackley, C., Colwill, K., Moran, M. F., and McFadden, G.** (2004). Myxoma virus M11L prevents apoptosis through constitutive interaction with Bak. *J Virol* **78**(13), 7097-111.
- Wang, H. G., Miyashita, T., Takayama, S., Sato, T., Torigoe, T., Krajewski, S., Tanaka, S., Hovey, L., 3rd, Troppmair, J., Rapp, U. R., and et al.** (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* **9**(9), 2751-6.

- Wang, S., and El-Deiry, W. S.** (2003). Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25), 15095-100.
- Wang, X.** (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**(22), 2922-33.
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J.** (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**(16), 2060-71.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J.** (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517), 727-30.
- Wen, L. P., Fahrni, J. A., Troie, S., Guan, J. L., Orth, K., and Rosen, G. D.** (1997). Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* **272**(41), 26056-61.
- Wieder, T., Prokop, A., Bagci, B., Essmann, F., Bernicke, D., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., Schmalz, H. G., Daniel, P. T., and Henze, G.** (2001). Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia* **15**(11), 1735-42.
- Yang, E., and Korsmeyer, S. J.** (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **88**(2), 386-401.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.** (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**(3), 673-82.

-
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., and Kroemer, G.** (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* **182**(2), 367-77.
- Zhang, L., Yu, J., Park, B. H., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.** (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* **290**(5493), 989-92.
- Zörnig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G.** (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1551**(2), F1-37.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X.** (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**(17), 11549-56.

ERKLÄRUNG

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“