

**Molekulare Mechanismen  
der Inhibition TGF- $\beta$ -induzierter  
Apoptose in Hepatomzellen**

**DISSERTATION**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Christoph Lars Bünemann

Tag der mündlichen Prüfung:	14. April 2000
Dekan:	Prof. Dr. U. Nagel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Schwarz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. W. Bock

Die vorliegende Arbeit wurde an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen am Institut für Toxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Schwarz durchgeführt.

## **DANKSAGUNG**

Herrn Professor Dr. Karl Walter Bock danke ich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu betreuen und an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen zu vertreten.

Herrn Professor Dr. Michael Schwarz danke ich für die Bereitstellung eines Laborplatzes und für die hervorragende Unterstützung dieser Arbeit.

Dem Arbeitskreis Pfaff des Instituts für Toxikologie danke ich für die Hilfe bei der Isolierung intakter Mitochondrien.

Professor Dr. Hans-Georg Rammensee, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Tübingen, danke ich für die Bereitstellung eines Cytofluorometers.

Professor Dr. Alfred Nordheim, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Tübingen, danke ich für die Bereitstellung eines Luminometers.

Wiebe Kruijer, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, Haren, Niederlande, danke ich für das pGL3ti(SBE)<sub>4</sub>-Reporter-Gen-Plasmid.

Claudia Willy danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Versuchen zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung.

Alexander Schmiechen, Florian von der Mülbe und Christina Unger danke ich für die Einführung in verschiedene Labortechniken.

Allen Laborkolleginnen und -kollegen sowie der Kaffeerrunde danke ich für produktive Diskussionen, Hilfsbereitschaft und gutes Arbeitsklima.



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Mehrstufenmodell der Kanzerogenese .....	1
1.2	Tumorpromotion in der Nagerleber .....	1
1.3	Apoptose .....	2
1.3.1	Caspasen – die Apoptose-Exekutive .....	2
1.3.2	Mitochondrien – Nekrose oder Apoptose? .....	5
1.3.3	Die Bcl-2-Proteinfamilie – Intrazelluläre Entscheidungsträger .....	8
1.3.4	Externe Regulatoren – Sein oder nicht Sein .....	10
1.3.4.1	Induktor TGF- $\beta$ .....	11
1.3.4.2	Inhibitor Insulin .....	13
1.3.4.3	Modulator Dexamethason .....	14
1.3.4.4	Proteinkinasen – Netzwerk intrazellulärer Signale .....	14
1.4	Aufgabenstellung .....	17
<b>2</b>	<b>Materialien und Hilfsmittel .....</b>	<b>19</b>
2.1	Geräte .....	19
2.2	Chemikalien und Biochemikalien .....	21
2.3	Plasmide .....	23
2.4	Bakterienstämme und Zelllinien .....	23
2.5	Lösungen und Puffer .....	24
2.6	Reagenziensets .....	27
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2	Behandlung von Zellen in Kultur .....	31
3.3	Zellaufarbeitung zum Nachweis von Bax, Bcl-x <sub>L</sub> , Phospho-Akt/PKB, Phospho-c-Jun und Phospho-ERK im Western-Blot .....	32
3.4	Mitochondrienisolierung und Cytosolgewinnung .....	33
3.5	Western-Blotting .....	37
3.6	TGF- $\beta$ -Reportergerätenalyse .....	44
3.7	Apoptoseuntersuchung im Cytofluorometer .....	46
3.8	Zellzyklusuntersuchung im Cytofluorometer .....	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
4.1	Die antiapoptotische Aktivität von Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin .....	55
4.2	Der antimutogene Effekt von TGF- $\beta$ und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren .....	57

4.3	Der Einfluß von Apoptoseinhibitoren auf den Smad-Signalweg .....	62
4.4	Aktivierung des ERK-Signalweges durch Apoptoseinhibitoren .....	66
4.5	Aktivierung des JNK-Signalweges durch Apoptoseinhibitoren .....	68
4.6	Aktivierung der Proteinkinase B (Akt/PKB) durch Apoptoseinhibitoren .....	70
4.7	Die Modulation des zellulären Bax-Gehalts durch Apoptoseinhibitoren .....	72
4.8	Die Modulation des zellulären Bcl-x <sub>L</sub> -Gehalts durch Apoptoseinhibitoren .....	74
4.9	Zusammenfassung der Untersuchung allgemein antiapoptotischer Mechanismen .....	76
4.10	Bedeutung der Cytochrom c-Freisetzung in der TGF-β-induzierten Apoptose .....	77
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>81</b>
5.1	Die antiapoptotische Aktivität von Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin .....	82
5.2	Der antimitogene Effekt von TGF-β und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren .....	84
5.3	Untersuchung des Smad-Signalweges .....	87
5.4	Aktivierung von Proteinkinasen .....	89
5.4.1	Aktivierung des ERK-Signalweges .....	89
5.4.2	Aktivierung des JNK-Signalweges .....	90
5.4.3	Aktivierung der Proteinkinase Akt/PKB .....	91
5.5	Expression von Bcl-2-Proteinen .....	92
5.5.1	Bax-Expression .....	92
5.5.2	Bcl-x <sub>L</sub> -Expression .....	93
5.6	Bedeutung der Cytochrom c-Freisetzung .....	94
5.7	Zusammenfassung .....	96
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>99</b>
6.1	Versuchsdaten und Statistik .....	99
6.1.1	Die antiapoptotische Aktivität von Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin .....	99
6.1.2	Der antimitogene Effekt von TGF-β und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren .....	100
6.1.3	Der Einfluß von Apoptoseinhibitoren auf den Smad-Signalweg .....	103
6.1.4	Die Bedeutung der Cytochrom c-Freisetzung in der TGF-β-induzierten Apoptose .....	104
6.2	Literaturverzeichnis .....	105
6.3	Akademische Lehrer .....	127
6.4	Lebenslauf .....	128

**Abkürzungsverzeichnis**

AIF	Apoptose-induzierender Faktor, <i>apoptosis inducing factor</i>
AK	Antikörper
ANT	Adeninnukleotid-Translokator
Apaf	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma/leukaemia</i>
BH	Bcl-2-Homologiedomäne
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumine</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CCD	<i>Charge coupled device</i>
CED	Defekt im Zelltod, <i>cell death defective</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
Cyt.c	Cytochrom c
DED	<i>Death effector domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FL2	Fluoreszenzbereich 2
FSC	<i>Forward scatter</i>
HAc	Essigsäure
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i>
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>

IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
IRK	<i>Insulin-responsive kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeOH	Methanol
MKK	MAP-Kinase-Kinase
MKKK	MKK-Kinase
P-Akt/PKB	Phospho-Akt/PKB
P-c-Jun	Phospho-c-Jun
P-ERK	Phospho-ERK
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	Phenobarbital
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	<i>Phospho tyrosine-binding domain</i>
PT-Pore	<i>Permeability transition-pore</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SBE	<i>SMAD-binding element</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH	<i>Src homology domain</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TAK	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated protein kinase</i>
T $\beta$ R	TGF- $\beta$ -Rezeptor
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ , <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIP	<i>TGF-<math>\beta</math>-receptor interacting protein</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
VDAC	<i>Voltage dependent anion channel</i>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Mehrstufenmodell der Kanzerogenese**

Während der Initiation, dem ersten Schritt der Kanzerogenese, werden Körperzellen durch Mutationsereignisse in Tumorvorläuferzellen überführt. Diese können anschließend zu einem Klon auswachsen. Dieser Prozeß wird durch sogenannte Tumorpromotoren gefördert. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß sie bei Tumorvorläuferzellen das Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod so stören, daß Zellteilung überwiegt. Das kann dadurch geschehen, daß die Zelle zu schnellerer Zellteilung angeregt wird, daß Apoptose gehemmt wird oder durch einen Synergismus beider Effekte. Die initiierte Zelle erhält so einen Selektionsvorteil gegenüber den unveränderten Zellen (Schulte-Hermann *et al.*, 1981; Schulte-Hermann *et al.*, 1983; Schulte-Hermann *et al.*, 1990; Lucier *et al.*, 1991; Bayly *et al.*, 1994; Stinchcombe *et al.*, 1995; Kolaja *et al.*, 1996a). Im weiteren Verlauf der Kanzerogenese entsteht durch Mutation einer Tumorvorläuferzelle eine Tumorzelle. Dieses Ereignis wird Konversion genannt. In der anschließenden Progressionsphase erfolgt durch das Wechselspiel von Proliferation und Mutation schrittweise die Malignisierung der Tumorzelle.

### **1.2 Tumorpromotion in der Nagerleber**

Die Leber eignet sich besonders gut als Kanzerogenese-Modell, weil sich in ihr die Nachkommen initiiertter Zellen bereits in frühen Entwicklungsstadien morphologisch und funktionell recht gut charakterisieren lassen (Schulte-Hermann, 1985). Aus diesem Grunde werden viele Untersuchungen zur Kanzerogenese an diesem Organ durchgeführt. Viele Erkenntnisse wurden an Nagern, insbesondere an der Ratte gewonnen.

Bereits seit längerer Zeit ist die tumorpromovierende Wirkung von Phenobarbital bekannt (Peraino *et al.*, 1971). In der ersten Phase einer Phenobarbital-Behandlung beobachtet man eine Hypertrophie der Leber (Schulte-Hermann, 1985). Chronische Gabe von Phenobarbital führte in einer Reihe von Untersuchungen zu einer erhöhten Tumorzinzidenz in der Leber von Nagern (Rossi *et al.*, 1977; Butler *et al.*, 1978, Kitagawa *et al.*, 1980, Goldsworthy *et al.*, 1984). Als Grund dafür wird ein durch Phenobarbital vermittelter Wachstumsvorteil für präneoplastische Zellen gegenüber unveränderten Hepatocyten angesehen. Einigen Untersuchungen zufolge zeigt sich dieser Wachstumsvorteil in einer gesteigerten DNA-Synthese in initiierten Zellen: Diese teilen sich schneller (Schulte-Herrmann *et al.*, 1981; Klaunig, 1993). Dagegen bleibt an anderer Stelle die DNA-Synthese unverändert, während Apoptose gehemmt wird: Die Zellen sterben seltener (Bursch *et al.*, 1984; Schulte-Hermann *et al.*, 1990). Jüngste Untersuchungen zeigten, daß ein Phenobarbital-responsives DNA-Element von einem

Heterodimer der kernständigen Transkriptionsfaktoren CAR/NR113 (*constitutively activated receptor/nuclear receptor*) und RXR (*retinoid x receptor*) erkannt wird. Die Bindung von Phenobarbital an CAR konnte nicht nachgewiesen werden, Phenobarbital scheint aber dessen nukleäre Akkumulation zu fördern (zusammengefaßt in Savas *et al.*, 1999).

Auch Dieldrin ist ein nicht genotoxisches Hepatokarzinogen (Ashwood-Smith, 1981), das vermutlich als Tumorpromotor aktiv wird (Tennekes *et al.*, 1981; Tennekes *et al.*, 1982; Kolaja *et al.*, 1996b). Während die hepatokarzinogene Wirkung von Dieldrin bei der Maus bereits häufig beschrieben werden konnte, ist die Datenlage bei der Ratte widersprüchlich (Fitzhugh *et al.*, 1964; Ito *et al.*, 1983), wobei zumeist bei Ratten kein hepatokarzinogener Effekt gefunden wurde.

### 1.3 Apoptose

Zelltod spielt bei einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine bedeutende Rolle.

Der aktive Zelltod ist eine Form des Zelltods, die der aktiven Beteiligung von zelleigenen Komponenten bedarf. Die Apoptose (Kerr *et al.*, 1972) stellt den Typ 1 des physiologischen Zelltods dar (Schweichel und Merker, 1973). Der Begriff ist von einem griechischen Wort abgeleitet, das das herbstliche Fallen der Blätter umschreibt (Kerr *et al.*, 1972). Sie ist vermutlich die wichtigste Form des aktiven Zelltods und spielt bei vielen wichtigen Vorgängen im Organismus eine entscheidende Rolle, so z.B. bei der Entwicklung des Nervensystems oder bei der Immunabwehr. Eine Störung der Apoptose scheint zu einer Reihe von Erkrankungen beizutragen: Zu wenig Apoptose führt zu Krebs und zu Autoimmunerkrankungen, zu viel tritt bei Infarkten und eventuell auch bei der Alzheimerschen Erkrankung auf (Miller und Marx, 1998).

Von der Apoptose zu unterscheiden ist die Nekrose (Kerr *et al.*, 1972). Unter Nekrose versteht man eine unphysiologische Form des Zelltods, die auftritt, wenn Zellen durch Pathogene schwer geschädigt wurden (Searle *et al.*, 1982; Corcoran *et al.*, 1994; Schulte-Hermann *et al.*, 1995a), Nekrose tritt jedoch ebenso unter physiologischen Bedingungen auf und wurde auch als Typ 2 und Typ 3 des physiologischen Zelltods bezeichnet (Schweichel und Merker, 1973; Clarke, 1990).

#### 1.3.1 Caspasen – die Apoptose-Exekutive

Die Apoptose bedarf einer speziellen molekularen Maschinerie. Die zentrale Komponente dieser Maschinerie stellt das proteolytische System der Caspasen dar. Dieses kann durch eine Reihe von proapoptotischen Signalen aktiviert werden und führt letztlich zur

spezifischen Hydrolyse von Zielproteinen. Deren Spaltung scheint zu den beobachteten Apoptose-spezifischen zellmorphologischen Veränderungen zu führen (Thornberry und Lazebnik, 1998; Strohm und Schulze-Osthoff, 1998).

Caspasen sind Proteasen der Säuger, die aufgrund ihrer Homologie zu CED-3 (Ellis und Horvitz, 1986) entdeckt und mit Apoptose in Verbindung gebracht wurden. CED-3 ist ein für den Zelltod beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* notwendiges Genprodukt, so daß auf eine Rolle der Caspasen bei der Apoptose geschlossen wurde (Thornberry *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1993). Bisher wurden 14 Caspasen entdeckt.

Die Nomenklatur dieser teilweise mehrfach entdeckten und benannten Proteasen wurde vereinheitlicht, und Caspase wurde als Bezeichnung eingeführt („c“ für Cysteinprotease, „aspase“ für die Eigenschaft, nach einem Asparylrest hydrolytisch zu spalten). Die Numerierung erfolgt in der Reihenfolge ihrer Entdeckung (Alnemri *et al.*, 1996).

Caspasen zeichnen sich durch Gemeinsamkeiten in Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität aus (Nicholson und Thornberry, 1997). Sie werden als Proenzyme synthetisiert, die proteolytisch aktiviert werden. Die aus dieser Prozessierung hervorgehenden großen und kleinen Untereinheiten bilden zunächst Heterodimere, von denen wiederum zwei zu einem Tetramer assoziieren, das zwei scheinbar unabhängige katalytische Zentren besitzt (Walker *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Rotonda *et al.*, 1996). Caspasen gehören zu den Proteasen, die über eine hohe Substratspezifität verfügen. Sie hydrolysieren ein Protein ausschließlich nach einem Asparylrest. N-terminal dieses Asparylrestes müssen drei weitere spezifische Aminoacylreste liegen. Das von der Caspase bevorzugt erkannte Tetrapeptid scheint dabei auch die jeweilige biologische Funktion erklären zu können: Gruppe 1-Caspasen (Caspasen-1, -4, -5) sind spezifisch für das Spaltungsmotiv (W/L)EHD und scheinen vor allem bei Entzündungserscheinungen eine Rolle zu spielen. Gruppe 2- und Gruppe 3-Caspasen sind dagegen mit dem Apoptose-Geschehen assoziiert. Gruppe 2-Caspasen (Caspasen-2, -3, -7) sind spezifisch für DExD und sind Effektor-Caspasen, während den für (I/V/L)ExD-spezifischen Gruppe 3-Caspasen (Caspasen-6, -8, -9) eine Funktion als Initiator-Caspase zugeschrieben wird (Thornberry *et al.*, 1997). Eine weitere Einteilung der Caspasen kann aufgrund phylogenetischer Untersuchungen erfolgen (Thornberry und Lazebnik, 1998).

Caspasen aktivieren sich gegenseitig in der Art einer Enzymkaskade. Dabei unterscheidet man funktionell zwischen Initiator- und Effektor-Caspasen. Initiator-Caspasen stellen einen möglichen Startpunkt der Enzymkaskade dar und aktivieren die Effektor-Caspasen, die ihrerseits den Großteil der apoptotischen Zielproteine prozessieren. Der auffälligste, strukturelle Unterschied zwischen beiden scheint in der Prodomäne ihrer Zymogene zu

liegen: Die Prodomänen der Initiator-Caspasen scheinen größer zu sein als die der Effektor-Caspasen (Fraser und Evan, 1996), und es finden sich in ihnen Domänen, die bei ihrer Aktivierung eine entscheidende Rolle spielen: DED (*death effector domain*, gefunden in Pro-Caspase-8 und -10) und CARD (*caspase recruitment domain*, in Pro-Caspasen-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12, -13). Pro-Caspase-8 bindet an FADD (*Fas-associated protein with death domain*) über die DED beider Moleküle, Pro-Caspase-9 bindet über die CARD an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*). Beide Wechselwirkungen sind Voraussetzung für die Aktivierung dieser Pro-Caspasen infolge von apoptotischen Signalen (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996; Li, P. *et al.*, 1997). Es wird vermutet, daß diese Wechselwirkung eine Oligomerisierung der Pro-Enzyme ermöglicht, die die eigentliche Voraussetzung für die aktivierende Prozessierung der Pro-Caspasen darstellt (Gu *et al.*, 1995; Muzio *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Eine große Zahl weiterer Adapter-Proteine mit DED- und CARD-Domänen sind mittlerweile identifiziert worden, die bei der Weiterleitung apoptotischer Signale und bei der Regulation der Caspase-Aktivierung eine Rolle spielen und auf die hier nicht eingegangen werden kann (Aravind *et al.*, 1999; Kumar und Colussi, 1999).

Im Gegensatz zur induzierten Selbstprozessierung der Initiator-Caspasen werden Effektor-Caspasen, die weder DED noch CARD besitzen (Pro-Caspase-3, -6, -7, -14), durch aktivierte Initiator-Caspasen proteolytisch prozessiert und dadurch aktiviert.

In jüngerer Zeit wurden weitere Mechanismen bekannt, durch die die Aktivität von Caspasen reguliert wird, beispielsweise durch Phosphorylierung von Pro-Caspase-9 (Cardone *et al.*, 1998), durch S-Nitrosylierung des Cysteinylnrestes im aktiven Zentrum der Pro-Caspase-3 (Li, J. *et al.*, 1997; Mannick *et al.*, 1999), durch Adapterproteine wie c-FLIP (*FADD-like ICE inhibitory protein*; Irmeler *et al.*, 1997) und ARC (*apoptosis repressor with caspase recruitment domain*; Koseki *et al.*, 1998), durch Inhibitoren der Caspase-Aktivität wie CrmA (*cytokine response modifier A*; Ray *et al.*, 1992), p35 (Bump *et al.*, 1995) und den IAP (*inhibitor of apoptosis protein*; LaCasse *et al.*, 1998) sowie durch intrazelluläre Kompartimentierung der Caspasen und ihrer Cofaktoren (Porter, 1999; Cain *et al.*, 1999).

Das Konzept, daß Caspase-Aktivität ein unabdingbares Kennzeichen des apoptotischen Zelltods darstellt, wurde durch Experimente in Frage gestellt, in denen in Abwesenheit von Caspase-Aktivität Zelltod mit teilweiser apoptotischer Morphologie beobachtet werden konnte (bspw. Xiang *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1997; McCarthy *et al.*, 1997; Brunet *et al.*, 1998; Amarante-Mendes *et al.*, 1998). Als alternative Mediatoren dieser Form des Zelltods kommen AIF (*apoptosis inducing factor*; Susin *et al.*, 1999a), reaktive Sauerstoffspezies, erhöhte cytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Spiegel, Serin-Proteasen (Granzym B, Calpaine, Cathepsine, AP24; Borner und Monney, 1999) und Ras (Chi *et al.*, 1999) in Frage. Solche Mechanismen könnten jedoch auch dem nekrotischen, physiologischen Zelltod Typ 2 zugrunde liegen (Kitanaka und Kuchino, 1999). Der Caspase-unabhängige Zelltod scheint sich langsamer als der Caspase-vermittelte einzustellen, weil weniger effiziente Mechanismen Funktionen der Caspasen ersetzen müssen (Borner und

Monney, 1999). Da aufgrund morphologischer Merkmale nicht immer eindeutig zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden kann, wird derzeit versucht, neue, Mechanismus-basierte Definitionen dieser Begriffe zu entwickeln (Samali *et al.*, 1999; Vaux, 1999).

### **1.3.2 Mitochondrien – Nekrose oder Apoptose?**

Eine Beteiligung der Mitochondrien am nekrotischen Zelltod wurde aus der Beobachtung abgeleitet, daß sie im Laufe dieses Prozesses anschwellen und aufbrechen. Der nachfolgende Verlust an ATP führt zur Störung des Ionengleichgewichts der Zelle, was ihr nekrotisches Sterben auslösen könnte.

Die Bedeutung der Mitochondrien im apoptotischen Prozeß wurde bei Studien an einem zellfreien System erkannt: Apoptotische Phänomene, bspw. nukleäre Kondensation und DNA-Fragmentierung, waren vom Vorhandensein der Mitochondrien abhängig (Newmeyer *et al.*, 1994). Zudem wurde festgestellt, daß Zellen, die proapoptotische Stimuli erhalten und deren Caspasen gehemmt werden, dennoch sterben, wenn auch nicht in typisch apoptotischer Weise (z.B. McCarthy *et al.*, 1997; Hirsch *et al.*, 1997) und daß die Schädigung von Mitochondrien dabei eine Rolle zu spielen scheint (z.B. Xiang *et al.*, 1996). Gegenwärtig werden drei Hypothesen über die Art und Weise, wie Mitochondrien am Zelltod beteiligt sind, diskutiert: Über die Störung der oxidativen Phosphorylierung, über die Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies oder über die Freisetzung von Proteinen aus dem Mitochondrium.

Bereits vor Jahrzehnten erkannte man die Störung des mitochondrialen Elektronentransports, eine Voraussetzung der oxidativen Phosphorylierung, als früh auftretendes Zeichen für Zelltod (Scaife, 1966). Ceramid, ein *second messenger* der Apoptose, hemmt ebenfalls die Elektronentransportkette (García-Ruiz *et al.*, 1997), ebenso der CD95/Fas/Apo-1-Ligand (Adachi *et al.*, 1997). Ein Verlust an zellulärem ATP wird allerdings erst relativ spät im Apoptose-Prozeß beobachtet (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998), zudem wird ATP anderen Beobachtungen zufolge in späten Phasen des Apoptoseprozesses benötigt (Eguchi *et al.*, 1997). Obwohl also der Verlust des mitochondrialen ATP zum Zelltod führt, erscheint es alles in allem unwahrscheinlich, daß die Störung der Elektronentransportkette selbst Apoptose induziert. Vielmehr scheint ein daraus resultierender ATP-Mangel zu Nekrose zu führen.

Eine große Zahl apoptotischer Stimuli führt zu Lipidperoxidation und zu einer Erhöhung der Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in der Zelle (Bredesen, 1995). Allerdings scheinen ROS erst nach der Aktivierung von Caspasen aufzutreten (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Außerdem entfalten einige apoptotische Stimuli ihre Wirkung auch noch unter anaeroben Bedingungen (Jacobson

und Raff, 1995). Dies stellte die Bedeutung der ROS als wesentlichen Bestandteil des apoptotischen Geschehens in Frage.

Intensiv untersucht wird derzeit die Frage, wie Proteine aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Cytosol gelangen und zur Apoptose beitragen können.

Verschiedene Proteine sind im Intermembranraum des Mitochondriums lokalisiert, die ins Cytosol freigesetzt werden können und deren Freisetzung direkt mit dem apoptotischen Geschehen in Verbindung gebracht wurde. Es sind dies Pro-Caspase-3 (Mancini *et al.*, 1998), Pro-Caspase-2, Pro-Caspase-9 (Susin *et al.*, 1999b), AIF (*apoptosis-inducing factor*; Susin *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1999a) und Cytochrom c (Liu *et al.*, 1996).

Die Translokation von AIF ins Cytosol führt zu einer Abnahme des mitochondrialen Transmembranpotentials, zur Freisetzung von Cytochrom c und Pro-Caspase-9 ins Cytosol, zur Kondensation von Chromatin und zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Dies alles sind Aktivitäten, die durch den Breitband-Caspaseinhibitor Z-VAD.fmk nicht gehemmt werden können (Susin *et al.*, 1999a).

Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium während der Apoptose kann durch Bcl-2 (s. Kap 1.3.3) gehemmt werden (Yang J. *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997), und eine nachfolgende Aktivierung der Caspasen ist von der Anwesenheit von dATP abhängig (Liu *et al.*, 1996). Dabei wird zunächst Pro-Caspase-9 prozessiert, vermutlich durch Bildung des Säuger-Analogons des Apoptosoms in *C. elegans* (Hengartner, 1997), einem Proteinkomplex aus Cytochrom c, Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997) und Pro-Caspase-9. Dies führt zur Initiation der Caspase-Kaskade und in deren Folge zu Apoptose (Li, P. *et al.*, 1997). Dieser Prozeß scheint in einer übergeordneten Struktur stattzufinden, einem Komplex, der „Aposom“ genannt wurde (Cain *et al.*, 1999).

Die Cytochrom c-Freisetzung kann von Caspasen induziert werden. In diesen Fällen scheint Cytochrom c-Freisetzung zur Aktivierung von Effektor-Caspasen beizutragen. Dies ist z.B. bei CD95/Fas/Apo-1-Ligand-induzierter Apoptose der Fall (Vander Heiden *et al.*, 1997; Kuwana *et al.*, 1998). Nach z.B. UV-Bestrahlung, Staurosporin und Bax-Überexpression wird die Cytochrom c-Freisetzung durch Caspase-Inhibitoren nicht gehemmt (Bossy-Wetzell *et al.*, 1998; Vander Heiden *et al.*, 1997; Jürgensmeier *et al.*, 1998). Daraus wurde geschlossen, daß die Schädigung des Mitochondriums ein Schlüsselereignis im Apoptosegeschehen darstellt.

Die Schädigung des Mitochondriums führt nach Green und Reed (1998) in jedem Falle zum Zelltod: Entweder zur Apoptose durch Aktivierung von Caspasen oder zur Nekrose durch den Zusammenbruch der mitochondrialen Elektronentransportkette nach Verlust des mitochondrialen Cytochrom c. Dies führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und

zu einer Abnahme zellulärem ATPs. Welcher dieser Wege letztlich beschritten würde, hinge von der jeweiligen Ausstattung der Zelle mit Proteinen ab, die für den einen oder den anderen Weg notwendig seien.

Als Antwort auf die Frage, wie Proteine den Intermembranraum des Mitochondriums verlassen können, werden gegenwärtig zwei Hypothesen diskutiert. Die erste umfaßt einen Permeabilitätsübergang an der inneren Mitochondrienmembran, infolge dessen die hyperosmolare Matrix anschwillt, bis die äußere Mitochondrienmembran zumindest lokal reißt, da diese eine geringere Oberfläche aufweist als die innere Mitochondrienmembran und die Matrix ab einem bestimmten Volumen nicht mehr umfassen kann (Vander Heiden *et al.*, 1997). Einer zweiten Hypothese zufolge öffnen sich in der äußeren Mitochondrienmembran Kanäle, was dazu führt, daß proapoptische Proteine ins Cytosol gelangen können, wobei die äußere Mitochondrienmembran zumindest weitgehend intakt bleibt. Diese Idee wurde u.a. durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur einiger Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie gefördert (Muchmore *et al.*, 1996). Jedoch auch ein Bestandteil der PT-Pore (s.u.) selbst kommt zumindest für kleinere Proteine als Proteinkanal in Frage (Shimizu *et al.*, 1999).

Der Zusammenbruch des Transmembranpotentials der inneren Mitochondrienmembran ( $\Delta\Psi_M$ ) während der Apoptose (Petit *et al.*, 1996) wird als Zeichen einer Öffnung der mitochondrialen PT-Pore (*permeability transition-pore*) angesehen. Die PT-Pore ist ein riesiger Ionenkanal, dessen Aufbau und Struktur noch nicht vollständig bekannt ist. Ein Bestandteil an der inneren Mitochondrienmembran ist der Adeninukleotid-Translokator (ANT), ein Bestandteil an der äußeren Mitochondrienmembran ist Porin, auch VDAC (*voltage-dependent anion channel*) genannt. Diese Proteine gehen vermutlich an den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Membran eine Wechselwirkung ein und bilden so einen Kanal, durch den Moleküle mit bis zu 1.5 kDa Größe passieren können (Bernardi *et al.*, 1994; Zoratti und Szabò, 1995), was zum Zusammenbruch elektrochemischer Potentiale, zur Entkopplung der Atmungskette und zum Einfluß von Wasser in die hyperosmolare Matrix führt. Oxidantien und eine Erhöhung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration, die die PT-Pore direkt beeinflussen, verursachen eine Schädigung der äußeren Membran und die Freisetzung Caspase-aktivierender Proteine (Susin *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1997). Bax und der ANT-Aktivator Atractylosid induzieren sowohl Apoptose als auch PT (Xiang *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996b). Dagegen können Inhibitoren der PT-Porenöffnung, Cyclosporine, Bongkreksäure und andere, Apoptose hemmen (Zamzami *et al.*, 1996b). Auch das antiapoptische Bcl-2-Protein hemmt die PT-Porenöffnung (Zamzami *et al.*, 1996a).

Andere Untersuchungen legen nahe, daß die Öffnung der PT-Pore nicht an der Freisetzung von Proteinen ins Cytosol beteiligt ist. Demnach treten Cytochrom c-Freisetzung und Caspase-Aktivierung noch vor einer meßbaren Verminderung des  $\Delta\Psi_M$  auf, und erst dann induzieren Caspasen eine PT-Porenöffnung (Vander Heiden *et al.*, 1997; Susin *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Yang J. *et al.*, 1997; Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Demzufolge wäre die Freisetzung von Proteinen unabhängig von der Öffnung der PT-Poren, was für die Hypothese der Öffnung von anderen Proteinkanälen sprechen würde. Möglicherweise jedoch befindet sich die PT-Pore im Zustand niedriger Leitfähigkeit und öffnet und schließt sich so schnell, daß  $\Delta\Psi_M$  respirativ wiederhergestellt werden kann (Icha *et al.*, 1997), so daß es zum Aufreißen der äußeren Membran und zur Freisetzung mitochondrialer Proteine kommt, bevor ein Abfall von  $\Delta\Psi_M$  meßbar wird (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998; Green und Reed, 1998). Möglich ist auch eine Beeinflussung des  $K^+$ -Haushalts des Mitochondriums, der Hauptdeterminante des mitochondrialen Matrixvolumens (Halestrap, 1989; Reed, 1997a). Dies wird, weil ANT einen wichtigen  $K^+$ -Kanal an der inneren Mitochondrienmembran darstellt (Reed, 1997a), durch den Befund gestützt, daß Bax und ANT gemeinsam liposomale Membranen permeabilisieren können (Marzo *et al.*, 1998).

### **1.3.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie – Intrazelluläre Entscheidungsträger**

Eine große Anzahl intrazellulärer Faktoren beeinflusst die Entscheidung, ob eine Zelle aufgrund eines bestimmten Apoptosestimulus das Todesprogramm durchführt oder nicht. Prinzipiell sind dies alle Faktoren, die intrazellulär an der Vermittlung pro- oder anti-apoptotischer Signale beteiligt sind. Besonderes Interesse aber haben die Proteine der Bcl-2-Familie gefunden.

Das namensgebende Gen *bcl-2* (*B-cell lymphoma/leukaemia-2*) wurde zunächst als potentiell Onkogen identifiziert, das beim follikulärem B-Zell-Lymphom des Menschen eine Rolle spielen könnte. Es wurde in der Nähe der Translokationsbruchstelle t(14:18)(q32;q21) gefunden wurde, die bei der Entwicklung des Lymphoms eine Rolle spielt (Cleary *et al.*, 1986; Tsujimoto und Croce, 1986). Die Proteine dieser Familie besitzen eine Sequenzhomologie zu CED-9, das in *C. elegans* den programmierten Zelltod negativ reguliert (Hengartner *et al.*, 1992).

Zahlreiche Bcl-2-verwandte Proteine sind seither identifiziert worden. In der Primärstruktur zeichnen sie sich durch zumindest eine von vier Bcl-2-Homologiedomänen (BH1 bis BH4) aus. Die meisten der antiapoptotisch wirksamen Proteine besitzen zumindest je eine BH1- und eine BH2-Domäne und einen Membrananker am C-Terminus. Die proapoptotischen Proteine werden in zwei Unterfamilien aufgeteilt: Die eine zeichnet sich durch eine beträchtliche Ähnlichkeit zu Bcl-2 aus, und Proteine dieser Unterfamilie enthalten BH1, BH2, BH3 und einen Membrananker. Die Proteine der anderen Unterfamilie enthalten lediglich

eine BH3-Domäne und sind sonst nicht verwandt zu irgendwelchen bekannten Proteinen. Zu letzteren, sogenannten BH3-Proteinen, gehört auch das *C. elegans*-Protein EGL-1 (zusammengefaßt in Adams und Cory, 1998).

Bereits früh wurde postuliert, daß das Verhältnis der Zahl pro- und antiapoptotischer Proteine für das Überleben der Zelle entscheidend ist und durch ihre Fähigkeit zur Heterodimerisierung untereinander bedingt wird (Oltvai *et al.*, 1993). Die beobachtete Homo- und Heterodimerisierung der Bcl-2-Proteine untereinander wird durch Bindung der amphipathischen BH3-Domäne an eine von BH1, BH2 und BH3 gebildete, hydrophobe Spalte möglich (Muchmore *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997). Diese Wechselwirkung scheint die molekulare Grundlage proapoptotischer Bcl-2-Proteine zu sein, da bereits deren BH3-Domänen allein an antiapoptotische Familienmitglieder binden, diese dabei inaktivieren und scheinbar dadurch Apoptose induzieren (z.B. Chittenden *et al.*, 1995; Sattler *et al.*, 1997; Cosulich *et al.*, 1997; Diaz *et al.*, 1997; Holinger *et al.*, 1999). Daneben gibt es auch Hinweise auf eine proapoptotische Funktion von Bcl-2-Proteinen, die unabhängig von einer solchen Heterodimerisierung sind. Nach Apoptose-Stimuli bildet Bax ein Homodomer und inseriert als solches in die Mitochondrienmembran, wo es verschiedene Apoptose-Symptome verursacht (Hsu *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998; Jürgensmeier *et al.*, 1998), was mit dessen Wechselwirkung mit ANT (Marzo *et al.*, 1998) und mit VDAC (Shimizu *et al.*, 1999) erklärt werden könnte. BID und Bax liefern ein Beispiel für Wechselwirkungen zwischen proapoptotischen Proteinen: BID transloziert vom Cytosol zum Mitochondrium, bindet Bax und induziert dessen Konformationsänderung sowie die Freisetzung von Cytochrom c (Desagher *et al.*, 1999).

Fragmente von Bcl-2-Proteinen scheinen ebenfalls eine große Rolle im apoptotischen Geschehen zu spielen. So ist BID ein Substrat der aktivierten Caspase-8 (Li, H. *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Das BID-Fragment p15 BID inseriert in die äußere Mitochondrienmembran, wo es, vermutlich über eine Wechselwirkung mit Bcl-x<sub>L</sub>/Bcl-2 (Gross *et al.*, 1999) oder über eine Ionenkanalaktivität (Schendel *et al.*, 1999), die Freisetzung von Cytochrom c und nachfolgend Apoptose auslösen kann. Caspase-medierte Proteolyse von Bcl-x<sub>L</sub> oder Bcl-2 führt zur Bildung proapoptotischer Fragmente dieser Proteine, deren proapoptotische Eigenschaft über eine Caspase-Aktivierung vermittelt wird (Cheng *et al.*, 1997; Clem *et al.*, 1998). Hier scheint eine positive Rückkopplung der Caspaseaktivierung vorzuliegen, die vermutlich über Cytochrom c-Freisetzung vermittelt wird (Kirsch *et al.*, 1999).

Für den Mechanismus antiapoptotischer Wirkungen dieser Proteinfamilie werden ebenfalls verschiedene Mechanismen diskutiert. Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> findet man außer an der äußeren Mitochondrienmembran auch am endoplasmatischen Reticulum und an der Kernhülle (Krajewski *et al.*, 1993; González-García *et al.*, 1994; Ng *et al.*, 1997; Xu und Reed, 1998).

Dort könnte ihre Funktion in der Kontrolle der Translokation von Ionen oder von kleinen Proteinen (Muchmore *et al.*, 1996; Minn *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997) oder in der Hemmung der Aktivität von Bax, wie die der Bildung von Poren, bestehen (Schlesinger *et al.*, 1997; Antonsson *et al.*, 1997). Bcl-x<sub>L</sub> könnte die Aktivierung von Pro-Caspase-9 hemmen, indem es an Apaf-1 bindet (Pan *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998), so wie CED-9 an CED-4 bindet und dadurch die CED-3-Aktivierung hemmt (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Chaudhary *et al.*, 1998). Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> hemmen die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien (Yang J. *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1999) über einen Mechanismus, der in Verbindung mit ihrer Wechselwirkung mit VDAC stehen könnte (Martinou, 1999; Shimizu *et al.*, 1999). Weiterhin hemmen Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> die Caspase-abhängige Induktion von Apoptose durch Mikroinjektion von Cytochrom c (Li, F. *et al.*, 1997; Brustugun *et al.*, 1998), evtl. weil zumindest Bcl-x<sub>L</sub> Cytochrom c bindet (Kharbanda *et al.*, 1997). Die Aktivierung von Caspasen könnte außerdem durch Bildung eines Komplexes aus Pro-Caspase-8, Bap31, Bcl-x<sub>L</sub> und evtl. Apaf-1 am endoplasmatischen Reticulum gehemmt werden (Ng und Shore, 1998). p53-induzierte Apoptose könnte über die Bindung von Bcl-2 an p53BP-2 (*p53-binding protein-2*) gehemmt werden (Ryan *et al.*, 1994; Naumovski und Cleary, 1996). Außerdem bindet und hemmt Bcl-2 die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin, deren dephosphorylierte Substrate BAD bzw. NF-AT zur Apoptose bzw. zur Hemmung der Proliferation beitragen (zusammengefaßt in Reed, 1997b).

### **1.3.4 Externe Regulatoren – Sein oder nicht Sein**

Externe Faktoren des Überlebens von Zellen können spezifisch oder unspezifisch sein. Spezifisch sind solche, die über Wechselwirkung mit Rezeptoren ganz bestimmte intrazelluläre Wirkungen auslösen. Unspezifische Faktoren erkennen keine bestimmte Zielstruktur in der Zelle und können das Leben der Zelle begünstigen oder ihm entgegengestellt sein. Zu den unspezifischen Faktoren, die zu Zelltod führen können, gehören z.B. DNA-schädigende Faktoren, Hypoxie und oxidativer Streß. Die gleiche Wirkung wie der Mangel an spezifisch wirkenden Überlebenssignalen hat das Vorhandensein spezifischer Signale zum Absterben der Zelle. Insbesondere einige Rezeptoren der TNF-Familie (Tumor-Nekrose-Faktor) verfügen über einen direkten Zugang zur Todesmaschinerie der Caspasen: Durch Wechselwirkung mit verschiedenen Adapterproteinen sind sie in der Lage, die Aktivierung von Initiator-Caspasen zu induzieren. Über weitere Adapterproteine vermitteln sie Signale, die von Proteinkinasen vermittelt werden, die sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirksam sein können (Yang X. *et al.*, 1997; Ashkenazi und Dixit, 1998; Chang *et al.*, 1998; Alpert *et al.*, 1999). Von der Vielzahl weiterer Signalwege, die einen Einfluß auf das Überleben der Zelle haben, sollen hier nur die erwähnt werden, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung waren.

#### 1.3.4.1 Induktor TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) ist an der Gewebshomöostase der Leber beteiligt (Michalopoulos und DeFrances, 1997). TGF- $\beta$  wirkt als Induktor von Apoptose *in vitro* und *in vivo*, bei Hepatocyten und bei Hepatomzelllinien (Lin und Chou, 1992; Oberhammer *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1998; Buchmann *et al.*, 1999) und hemmt die Proliferation von Hepatocyten *in vitro* (Inagaki *et al.*, 1993). Tumorpromotoren wirken genau entgegengesetzt: antiapoptotisch und proliferationsfördernd. Möglicherweise inhibieren diese Substanzen TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose und TGF- $\beta$ -induzierte Proliferationshemmung. Und Substanzen, die diese Prozesse hemmen, könnten im Sinne des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese tumorpromovierend wirken. Bspw. sind Insulin und Dexamethason in der Lage, TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose zu inhibieren (Chuang *et al.*, 1994; Tanaka und Wands, 1996; Chen *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998; Buchmann *et al.*, 1999).

Die TGF- $\beta$ -Familie der Säuger besteht aus drei Mitgliedern: TGF- $\beta$ 1 bis -3. Bei Wirbeltieren finden sich zusätzlich TGF- $\beta$ 4 (Huhn) und TGF- $\beta$ 5 (*X. laevis*). Von diesen sind die Wirkungen des TGF- $\beta$ 1 die bestuntersuchten. Die TGF- $\beta$ -Familie gehört der TGF- $\beta$ -Superfamilie an. Dieser gehören außerdem die Aktivin/Inhibin- und die BMP-Familie (*bone morphogenetic protein*) sowie einige andere Proteine an (Alevizopoulos und Mermod, 1997).

TGF- $\beta$ 1 wird zunächst als Polypeptid von 392 Aminosäuren Länge gebildet. Nach proteolytischer Prozessierung nach AS279 bleiben die beiden Fragmente nicht-kovalent miteinander verbunden und dimerisieren zum *latency associated protein* (LAP) oder  $\beta$ 1-LAP. Durch Bindung des *latent TGF- $\beta$ -binding protein-1* (LTBP-1) bildet sich ein Komplex, der exportiert wird und durch Transglutaminase an die extrazelluläre Matrix gebunden wird.  $\beta$ 1-LAP wird proteolytisch durch eine Serinprotease freigesetzt, bindet an den Mannose-6-Phosphat/IGF-II-Rezeptor (M6P/IGF2-Rezeptor) und wird dort von Plasmin prozessiert, wodurch aktives TGF- $\beta$ 1 freigesetzt wird (zusammengefaßt in Gleizes *et al.*, 1997).

Die TGF- $\beta$ -Rezeptoren werden in die 3 Unterfamilien der Typ I- bis Typ III-Rezeptoren (T $\beta$ RI bis T $\beta$ RIII) eingeteilt. Während T $\beta$ RII alleine hochaffin TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 bindet, ist für dessen Bindung von TGF- $\beta$ 2 zusätzlich T $\beta$ RIII notwendig. Dadurch kann einer der sechs bekannten T $\beta$ RI rekrutiert werden, der daraufhin durch die konstitutive S/T-Kinaseaktivität des T $\beta$ RII phosphoryliert werden kann (zusammengefaßt in Alevizopoulos und Mermod, 1997). T $\beta$ RI wird hierdurch aktiviert und vermag seinerseits unter Mithilfe des Adapterproteins SARA (*Smad anchor for receptor activation*; Tsukazaki *et al.*, 1998) eine Untergruppe von Smad-Proteinen (Derynck *et al.*, 1996), nämlich die Rezeptor-aktivierten Smads, zu phosphorylieren (Zhang *et al.*, 1996; Lagna *et al.*, 1996;

Marcias-Silva *et al.*, 1996). Derzeit bekannte Rezeptor-aktivierte Smads sind Smad1, -5 und -8, die die Signale der BMP vermitteln, sowie Smad2 und -3, die als Mediatoren von Activin und TGF- $\beta$  wirksam sind. Diese sind nach ihrer Phosphorylierung in der Lage, einen Komplex mit Smad4, einem allgemeinen Smad, einzugehen und in den Kern zu translozieren, wo sie gemeinsam an der transkriptionellen Kontrolle von Zielgenen beteiligt sind (zusammengefaßt in Zhang und Derynck, 1999). Die inhibitorischen Smad6 und -7 könnten ihre Wirkung über die Bindung an T $\beta$ RI (Hayashi *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997) oder an Rezeptor-aktivierte Smads (Nakao *et al.*, 1997; Topper *et al.*, 1997) entfalten. Da sie durch TGF- $\beta$ , Activin und BMP induziert werden (Imamura *et al.*, 1997; Ishisaki *et al.*, 1998; Takase *et al.*, 1998; Afrakhte *et al.*, 1998), scheint so ein negativer Rückkopplungsmechanismus für die gesamte TGF- $\beta$ -Superfamilie vorzuliegen.

Die transkriptionelle Kontrolle der Zielgene erfolgt in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren. Während Smad2 keine DNA-Bindungsaktivität aufweist (Shi *et al.*, 1998; Yagi *et al.*, 1999), binden Smad3 und -4 an CAGA- (bzw. GTCT-)ähnliche-DNA-Sequenzen (Yingling *et al.*, 1997; Dennler *et al.*, 1998; Jonk *et al.*, 1998; Zawel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998) und Smad4 bindet außerdem an eine zweiteilige, GC-reiche Sequenz in Activin-responsiven Sequenzen (Labbé *et al.*, 1998). Im TGF- $\beta$ -Signalweg scheinen Kooperationen mit den Transkriptionsfaktoren AP-1 (Zhang *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1999), TFE3 (Hua *et al.*, 1998), Vitamin D-Rezeptor und CRS-1/TIF2 (*steroid receptor coactivator-1/transcriptional intermediary factor 2*; Yanagisawa *et al.*, 1999), p300 und CBP (*CREB-binding protein*; Derynck *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 1998; Janknecht *et al.*, 1998; Topper *et al.*, 1998; Pouponnot *et al.*, 1998) bedeutsam zu sein. Eine Vielzahl weiterer direkter Wechselwirkungen können vermutet werden (zusammengefaßt in Alevizopoulos und Mermod, 1997) und eine Erklärungsbasis für die erstaunliche Vielfalt der Wirkungen von TGF- $\beta$  darstellen (Zhang und Derynck, 1999).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß es zumindest einen weiteren, TGF- $\beta$ -abhängigen Signalweg gibt (Laiho *et al.*, 1991; Derynck, 1994). Es wurden fünf weitere T $\beta$ R-assozierte Proteine identifiziert: ApoJ (Apolipoprotein J/Clusterin), TRIP-1 (*TGF- $\beta$ -receptor interacting protein-1*), FKBP12, Farnesyltransferase  $\alpha$  (zusammengefaßt in Alevizopoulos und Mermod, 1997) und die regulatorische B $\alpha$ -Untereinheit der Phosphatase 2A, die die antimitogene Wirkung von TGF- $\beta$  verstärkt (Griswold-Prenner *et al.*, 1998). TRIP-1 moduliert die TGF- $\beta$ -Antwort in Rezeptor-abhängiger und -unabhängiger Weise (Choy und Derynck, 1998). FKBP12 wurde mit einer Erhöhung der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im TGF- $\beta$ -Signalweg in Verbindung gebracht. Farnesyltransferase  $\alpha$  wird im Zusammenhang mit der Rolle von Ras, Rac und Rho sowie mit der Aktivierung von diversen Mitgliedern der MAPK-Superfamilie (*mitogen-activated protein kinase*) im TGF- $\beta$ -Geschehen gesehen. Weiter

wurde TAK1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase 1*) identifiziert, eine Proteinkinase, die zur Aktivierung von MKK3, -4, -6 und -7 (*MAP kinase kinase*) führt, die ihrerseits die Aktivierung von JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38MAPK bewirken. Dies kann zu Apoptose und zu Zellzyklusarrest führen (Alevizopoulos und Mermod, 1997; Dhanasekaran und Premkumar Reddy, 1998).

Zu den biologischen Wirkungen von TGF- $\beta$  in Differenzierung, Morphogenese und Wundheilung gehören neben dem Einfluß auf Apoptose (s.o.) auch die Regulation des Zellwachstums (Sporn *et al.*, 1986; Wollenberg *et al.* 1987; Roberts und Sporn, 1990; Massagué *et al.*, 1990). Zu einem antiproliferativen Effekt könnten die verstärkte Expression von p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Datto *et al.*, 1995), p27<sup>Kip1</sup> (Polyak *et al.*, 1994) und p15<sup>Ink4B</sup> (Hannon und Beach, 1994) beitragen. Deren inhibitorische Wirkung auf Cyclin A-, D- und E-abhängige Kinasen (Cdk, *cyclin dependent kinase*; zusammengefaßt in Sherr, 1996) kann ebenso wie die beobachtete, TGF- $\beta$ -abhängige, transkriptionelle Repression der Cycline A und E sowie von Cdk2 und -4 (Ewen *et al.*, 1993; Geng und Weinberg, 1993; Barlat *et al.*, 1995) andere Zellzyklus-relevante Beobachtungen erklären. Zu diesen gehören die Hemmung der Phosphorylierung des Retinoblastomprotein Rb (Laiho *et al.*, 1990), die verminderte Expression von c-Myc (Pietenpol *et al.*, 1990) sowie die Wachstumshemmung durch TGF- $\beta$ .

#### **1.3.4.2 Inhibitor Insulin**

Unter der Vielfalt der Insulin-Wirkungen findet sich auch die Hemmung TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose in Modellen der Leber (Chuang *et al.*, 1994; Tanaka und Wands, 1996; Chen *et al.*, 1997; Buchmann *et al.*, 1999).

Zu den IGF (*insulin-like growth factor*) gehören Insulin, IGF1 und IGF2. Sie wirken mitogen und werden mit Tumorwachstum und Apoptoseinhibition in Verbindung gebracht (Baserga, 1994). Nach Bindung von Insulin an seinen Rezeptor IRK (*insulin responsive kinase*) ist dieser in der Lage, durch Autophosphorylierung Phosphotyrosinreste zu bilden. Diese bilden Bindungsstellen für Proteine mit SH2- (*src homology*) oder PTB-Domänen (*phosphotyrosine-binding*). Eine Vielzahl von Molekülen binden an den so aktivierten IRK und leiten das Insulin-Signal intrazellulär weiter. Zu diesen Molekülen gehören die IRS-Proteinfamilie (*insulin receptor substrate*), pp60/IRS-3 (*phosphotyrosine protein 60 kDa*) und Shc, das über die Proteine Grb2 und Sos zur Aktivierung des MAP-Kinaseweges Ras/Raf/ERK (*extracellular-signal regulated kinase*, häufig auch als MAPK bezeichnet) führt. An die Proteine der IRS-Proteinfamilie können weitere Proteine binden, die hierdurch an der Signaltransduktion beteiligt werden. Zu diesen gehören PI3K (Phosphatidylinositol-3'-Kinase) und wiederum Shc. PI3K-Aktivierung durch dessen Bindung an IRS-Proteine (außer an p62<sup>dok</sup>) führt unter anderem zur Aktivierung von Akt/PKB (Proteinkinase B) und Rac, das

zur Aktivierung der MAP-Kinase JNK führt (zusammengefaßt in White, 1998; Ogawa *et al.*, 1998; Ceresa und Pessin, 1998; Avruch *et al.*, 1998). IRS-1 ist das Hauptsubstrat sowohl für IRK als auch für den IGF1-Rezeptor (Sara und Hall, 1990; Myers *et al.*, 1994). IRS-1 wird in humanen, hepatozellulären Karzinomen hochreguliert vorgefunden (Nishiyama und Wands, 1992). Mit einer anti-apoptotischen Funktion werden sowohl der Ras/Raf/ERK-Signalweg (Xia *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1995a; Kinoshita *et al.*, 1995b; Leverrier *et al.*, 1997; Chao *et al.*, 1997) als auch die Aktivität von Akt/PKB (Ahmed *et al.*, 1997; Dudek *et al.*, 1997; Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997; Khwaja *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998) und von Rac (Boehm *et al.*, 1999) belegt.

### **1.3.4.3 Modulator Dexamethason**

Dexamethason, ein Glucocorticoid-Steroidhormon, bindet an seinen spezifischen Rezeptor, der als Transkriptionsfaktor an der Regulation einer Reihe von Zielgenen beteiligt ist. Glucocorticoide regulieren die Zellproliferation (Harmon *et al.*, 1979; Tsai und O'Malley, 1994). Da sie auch in der Lage sind, Apoptose zu induzieren, wurden sie zur Behandlung von lymphoiden Leukämien und Lymphomen eingesetzt (Bansal *et al.*, 1991). Apoptose induzieren sie auch in Thymocyten der Ratte (Wyllie, 1980). Dagegen können Glucocorticoide zumindest in folgenden Zelltypen Apoptose inhibieren: In Neutrophilen (Cox, 1995), Lungenepithelzellen (Wen *et al.*, 1997), in Fibroblasten (Dijkmans und Billiau, 1991) sowie in Karzinom-abgeleiteten Zellen des Magen-Darm-Traktes (Chang *et al.*, 1997) und der Rattenleber (Yamamoto *et al.*, 1998). Diese Wirkung wurde bei TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose mit der Hemmung der Phospholipase A<sub>2</sub> in Verbindung gebracht (Hepburn *et al.*, 1987; Palombella and Vilcek, 1989; Suffys *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992). Dies scheint jedoch in TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose zumindest in manchen Zellsystemen keine Rolle zu spielen (Yamamoto *et al.*, 1998). Als weitere Mechanismen werden die Steigerung der Expression von Bcl-x<sub>L</sub> und die Hemmung des Anstiegs des Bcl-x<sub>S</sub>, einer proapoptotischen Spleißvariante von Bcl-x<sub>L</sub>, infolge der Apoptoseinitiation diskutiert (Chang *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998).

### **1.3.4.4 Proteinkinasen – Netzwerk intrazellulärer Signale**

#### **1.3.4.4.1 Apoptoseinhibitor Akt/PKB**

Akt/PKB steht unter der Kontrolle der PI3K, die aus einer von mindestens zwei 110 kDa-katalytischen und einer von mindestens fünf regulatorischen Untereinheiten besteht und durch Insulin via IRS-Proteine (zusammengefaßt in White, 1998), durch Ras (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997) oder durch TNF $\alpha$  via TNFR1 (*TNF receptor type-1*) aktiviert wird (Guo und Donner, 1996). PI3K katalysiert unter anderem die Phosphorylierung der 3'-Position des Inositolrings in Phosphatidylinositolen. An die Produkte der PI3K können eine Reihe

von Molekülen binden, die hierdurch zur Zellmembran rekrutiert werden. Dazu gehören die Proteinkinasen der Tec-Familie, PDK1 und Akt/PKB. Dies und eine evtl. damit einhergehende Konformationsänderung scheinen für die Akt/PKB-aktivierende Phosphorylierung durch PDK1 (*Phosphatidylinositol(3,4,5)-tri-phosphate-dependent kinase*) und evtl. PDK2 erforderlich zu sein (zusammengefaßt in Marte und Downward, 1997 und in Corvera und Czech, 1998). Außerdem kann Akt/PKB direkt durch CaM-KK ( $Ca^{2+}$ /*calmodulin-dependent kinase*) aktiviert werden (Yano *et al.*, 1998). Die anti-apoptotische Wirkung von Akt/PKB (s. Kap. 1.3.4.2) kann auf die Phosphorylierung von einigen ihrer Substrate zurückgeführt werden (zusammengefaßt in Khwaja, 1999). Die Umsetzung von BAD, einem proapoptotischen Bcl-2-Protein, führt zu dessen Bindung an 14-3-3-Proteine (Datta *et al.*, 1997), wodurch dessen Hemmung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> aufgehoben wird (Yang *et al.*, 1995; zusammengefaßt in Kroemer, 1997). Die Akt/PKB-abhängige Inhibition von Caspase-9 wurde bereits erwähnt. Die Transkriptionsfaktoren FKHRL1 und AFX der Forkhead-Familie, die Apoptose z.B. durch die Transaktivierung des CD95/Fas/Apo-1-Liganden induzieren können, werden durch Phosphorylierung an ihrer Translokation in den Kern gehindert (Brunet *et al.*, 1999; Kops *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von IKK $\alpha$  (I $\kappa$ B-Kinase  $\alpha$ ) führt zu deren Aktivierung, was in einem proteolytischen Abbau seines Substrats I $\kappa$ B (*inhibitory  $\kappa$ B-protein*) und einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Proteinen (*nuclear factor  $\kappa$ B*) resultiert (Romashkova *et al.*, 1999; Ozes *et al.*, 1999). Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt seinerseits zur Proliferation und zur Inhibition von Apoptose (zusammengefaßt in Foo und Nolan, 1999). Die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*) durch Akt/PKB (Dimmeler *et al.*, 1999) stellt eine Verbindung zur antiapoptotischen Wirkung von NO her. Und schließlich wurde auch die Akt/PKB-abhängige Hemmung von GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) mit der Hemmung von Apoptose in Verbindung gebracht (Pap und Cooper, 1998).

#### **1.3.4.4.2 Vielfalt der MAP-Kinasen**

MAPK-Kaskaden werden durch eine Vielzahl von Signalen aktiviert. Die typische, dreiteilige MAP-Kinasekaskade besteht aus der namensgebenden MAP-Kinase (ERK1/2, JNK, p38MAPK, ERK5) sowie den übergeordneten MKK (MAPK-Kinase) und MKKK (MKK-Kinase). Zumindest in Streß-assoziierten MAP-Kinasewegen (JNK, p38MAPK) wurden außerdem MKKKK (MKKK-Kinase) gefunden. Die biologischen Funktionen der MAP-Kinasekaskaden sind die Regulation von Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Streßantwort. Diese Funktionen werden durch die Phosphorylierung der jeweiligen spezifischen Substratproteine vermittelt. Zu diesen gehören auch Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (Dhanasekaran und Reddy, 1998; Ip und Davis, 1998). Viele

Komponenten der MAPK-Kaskaden sind an mehr als einer Kaskade beteiligt, bedingt durch die relative geringe Substratspezifität der Adaptermoleküle und der Proteinkinasen und -phosphatasen. Daraus ergibt sich eine mannigfaltige Quervernetzung der Kaskaden. Die Zelle ist aber in der Lage, diese Quervernetzung aufzuheben und so eine spezifische Zellantwort zu ermöglichen. Dies geschieht vermutlich durch die räumliche Annäherung der Komponenten eines spezifischen Signalweges durch vernetzende Proteine (Pawson und Scott, 1997; Elion, 1998; Schaeffer *et al.*, 1998; Whitmarsh *et al.*, 1998).

Bekannte Aktivatoren des Ras/Raf/ERK-Weges sind vor allem Wachstumsfaktoren. Der Eintritt in diesen Signalweg kann über eine große Anzahl verschiedener Moleküle erfolgen (Whitmarsh und Davis, 1996; Sugden und Clerk, 1997), und Ras seinerseits führt zur Aktivierung einer Vielzahl weiterer Signalwege (Campbell *et al.*, 1998). Dem Ras/Raf/ERK-Weg werden vor allem antiapoptotische (s. Kap. 1.3.4.2) und proliferative (Kerkhoff und Rapp, 1998) Eigenschaften zugesprochen. Eine antiapoptotische Eigenschaft dieses Signalweges kann mit der Phosphorylierung von BAD erklärt werden: Bcl-2 geleitet Raf-1 (eine MKKK) zum Mitochondrium, wo diese die Phosphorylierung von BAD bewirkt. Dies hat die Aufhebung der proapoptotischen BAD-Aktivität zur Folge. (Zha *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Den TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg können Ras/MKK/ERK über Phosphorylierung von Smad2/3 inhibieren (Kretzschmar *et al.*, 1999).

Der JNK-Signalweg wird von Wachstumsfaktoren, proinflammatorischen Cytokinen, Zellstreß, TNF $\alpha$  und vom CD95/Fas/Apo-1-Ligand aktiviert. Ihm wird eine Funktion bei onkogener Transformation, bei Entzündungsprozessen und bei Apoptose zugeschrieben. Zumindest ein Teil dieser biologischen Funktionen scheint in Kooperation mit dem p38MAPK-Signalweg zu erfolgen, da dieser mit dem JNK-Signalweg einige Aktivatoren, MKKKK, MKKK, MKK sowie einige Zielproteine gemeinsam hat. Beide Signalwege entfalten ihre Wirkung über die Regulation von Zielproteinen, vorwiegend Transkriptionsfaktoren, und beide Signalwege können Apoptose fördern oder auslösen. Dabei können JNK- und p38MAPK-Signale Caspase-abhängig aktiviert werden, während sie unter anderen Bedingungen, auch bei CD95/Fas/Apo-1-Ligand-induzierter Apoptose, selbst die Aktivierung von Caspasen bewirken. Nur vom JNK-Signalweg ist bekannt, daß er unter bestimmten Bedingungen eine antiapoptotische Funktion aufweisen kann (Whitmarsh und Davis, 1996; Ip und Davis, 1998; Dhanasekaran und Reddy, 1998).

### **1.4 Aufgabenstellung**

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob im Apoptosemechanismus von Hepatomzellen ein universeller Angriffspunkt für Tumorpromotoren bzw. Apoptoseinhibitoren existiert. Dies ist von Interesse, da ein solcher, universeller Angriffspunkt einen exzellenten, biologischen Endpunkt eines Testsystems auf tumorpromovierende Eigenschaften einer Substanz darstellen würde.

Hierzu wurde anhand der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose folgendes untersucht:

- Die Wirksamkeit möglicher Apoptoseinhibitoren.
- Der Einfluß von Apoptoseinhibitoren auf den antimitogenen Effekt von TGF- $\beta$ .
- Der Einfluß von Apoptoseinhibitoren auf den Smad-Signalweg von TGF- $\beta$ .
- Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch Apoptoseinhibitoren.
- Aktivierung des JNK-Signalweges durch Apoptoseinhibitoren.
- Aktivierung der Proteinkinase B (Akt/PKB) durch Apoptoseinhibitoren.
- Die Modulation des zellulären Bax-Gehalts durch Apoptoseinhibitoren.
- Die Modulation des zellulären Bcl-x<sub>L</sub>-Gehalts durch Apoptoseinhibitoren.
- Die Bedeutung der Cytochrom c-Freisetzung in der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose.

Alle Untersuchungen wurden an FTO-2B-Rattenhepatomzellen durchgeführt. Weitere Untersuchungen zur Klärung der Bedeutung der Ergebnisse der Untersuchungen des antimitogenen Effekts und des Smad-Signalweges wurden an humanen HepG2-Hepatoblastomzellen durchgeführt.



## 2 Materialien und Hilfsmittel

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Elektrophorese

Modell	Quelle
Trans-Blot (Proteintransfer)	Bio-Rad
V150 / 90 (SDS-PAGE, Normalgel)	EMBL, Heidelberg
Mini-V8-10 (SDS-PAGE, Minigel)	Life Technologies
horizontale Elektrophoreseapparatur	Harnischmacher Labortechnik

#### 2.1.2 Homogenisatoren

Modell	Quelle
1 ml Homogenisator, konisch, mit Teflon-Pistill	Wheaton
0.5 ml Homogenisator mit Teflon Pistill	Wheaton
Rührwerk RW18	IKA-Werk
Labsonic 2000 (Ultraschallgerät)	B.Braun

#### 2.1.3 Inkubatoren

Modell	Quelle
Bakterieninkubator B6, Function Line	Heraeus
Schüttelinkubator Multitron	Infors AG
Function Line BB 16 (Brutschrank)	Heraeus
Function Line BB 16 CU (Brutschrank)	Heraeus

#### 2.1.4 Kunststoffmaterial

Modell	Quelle
konisches Reagenzglas, Polypropylen, 50 ml (2070)	Falcon
konisches Reagenzglas, Polypropylen, 15 ml (2096)	Falcon
Bakterienröhrchen, 13 ml	Sarstedt
Kunststoffröhrchen, 5 ml, 75 x 12 mm Ø	Sarstedt
FACS-Röhrchen	Falcon
Gewebekultur-Petrischalen, 10 cm Ø (3003)	Falcon
Gewebekultur-Petrischalen, 6 cm Ø (3004)	Falcon
Gewebekultur-Petrischalen, 3.5 cm Ø (3001)	Falcon
„6-well“ Gewebekulturschale (3224)	Falcon
„24-well“ Gewebekulturschale (3226)	Falcon
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup> (3084)	Falcon
Einmal-Pipetten 10 ml (7551)	Falcon
Einmal-Pipetten 5 ml (7543)	Falcon
Einmal-Pipetten 1 ml (7520)	Falcon
Wischer (Zellschaber)	neoLab
Multi-Flex-Tips, 5-200 µl, flach, 0.4 mm	Roth
Einmal-Küvetten, halbmikro, PMMA	Plastibrand

#### 2.1.5 Membranen, Papiere

Modell	Quelle
Kimwipes	Kimberly-Clark
Saran-Wrap (Frischhaltefolie)	Dow-Chemical
Mikrocon 10 (Ultrafiltrationseinheit)	Amicon
Sterilfilter, Porengröße 0.2 µm	Schleicher&Schuell
Immobilon PVDF Transfer Membrane	Millipore
3 MM (Filterpapier)	Whatman

**2.1.6 Optische Geräte**

Modell	Quelle
FACSCalibur (Cytofluorometer)	Becton-Dickinson
CCD-Kamera zur Chemilumineszenzmessung	Raytest
Lumat LB 9507 (Luminometer)	EG&G Berthold
Quarzglas Mikroküvette 105.202.08-QS	Hellma
Crosslinker AX 20/1 (UV-Bestrahlung)	Biometra
Ultrospec 2000 (Spektralphotometer)	Pharmacia
LKB•Ultraspec II (Spektralphotometer)	Pharmacia

**2.1.7 Software**

Produkt	Quelle
TINA V2.09a	Raytest
CCD-Kamera Software	Raytest
CellQuest 3.0.1.f	Becton-Dickinson
ModFit LT V2.0 (PMac)	Becton-Dickinson
Excel 5.0c und 97	Microsoft
Origin V3.5	Microcal

**2.1.8 Spannungsquellen**

Modell	Quelle
Phero-stab.	Biotec-Fischer
LKB•GPS 200/400	Pharmacia
LKB•EPS 500/400	Pharmacia

**2.1.9 Thermische Geräte**

Modell	Quelle
FK (Wasserbad mit Schlauchanschluß)	Haake
Wasserbad 1001	GFL
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermoblock Biotherm BT-11	IDL

**2.1.10 Zentrifugen und Rotoren**

Modell	Quelle
SS34 (Festwinkelrotor)	Sorvall
A12-11 (Ausschwingrotor)	Eppendorf
F45-30-11 (Festwinkelrotor)	Eppendorf
Mikro Rapid/K (Kühlzentrifuge für 1.5 ml Reaktionsgefäße)	Hettich
Biofuge 13 (Zentrifuge für 1.5 ml Reaktionsgefäße)	Heraeus
Megafuge 10 R (Kühlzentrifuge für größere Reaktionsgefäße)	Heraeus
Minifuge T (Kühlzentrifuge für größere Reaktionsgefäße)	Heraeus

**2.2 Chemikalien und Biochemikalien****2.2.1 Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Quelle</b>
Aceton	Riedel-de-Haën
Acrylamidlösung 30% (rotiphorese Gel A)	Roth
Agarose	Life-Technologies
Agarose Ultrapure	Life Technologies
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Life-Technologies
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Boehringer-Mannheim
Bacto Agar	Difco
<i>Bacto tryptone</i>	Difco
<i>Bacto yeast extract</i>	Difco
BCA-Proteintest, Reagenz A	Pierce
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
BSA Fraktion V, Lyophilisat	Serva
BSA für die Molekularbiologie	Serva
Calciumchlorid, Dihydrat	Merck
CDP-Star	Tropix
Dexamethason	Sigma
Dieldrin	Sigma
DMEM/Ham's F12	Gibco
DMSO (D-5879)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Serva
Essigsäure (> 99,8%)	Riedel-de-Haën
Ethidiumbromid	Serva
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies
Glyzerin	Merck
$\beta$ -Glycerolphosphat, Dinatriumsalz, Hydrat	Sigma
Glycin-Puffersubstanz für die Elektrophorese	Merck
HEPES	Merck
1 M HEPES, pH7.4 (15630-056)	Gibco
I-Block	Tropix
Insulin	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kupfersulfat, Pentahydrat	Merck
Leupeptin, Hydrochlorid	Sigma
Magnesiumdichlorid, Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Mangandichlorid, Tetrahydrat	Merck
Mannose	Merck
$\alpha$ MEM	Biochrom
Methanol	Merck
Milchpulver (170-6404)	BioRad
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth

Substanz	Quelle
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumpyrophosphat	Sigma
Natriumsulfit	Merck
Nonidet P-40	Serva
Nitro-Block-II	Tropix
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin-/Streptomycin-Lsg. (10000 U <sub>/ml</sub> / 10 mg <sub>/ml</sub> )	Biochrom
Pepstatin A (P 4265)	Sigma
Phenobarbital	Th. Geyer
PIPES	Merck
PMSF	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
RPMI mit Glutamin (21875-034)	Gibco
Saccharose	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
Staurosporin	Sigma
TEMED	Merck
humanes TGF-β1	Amersham-Pharmacia
Titriplex III (EDTA)	Merck
Titriplex VI (EGTA)	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100, rein	Merck
Trypsin 0.05 % <sup>w/v</sup> / EDTA 0.02 % <sup>w/v</sup> in PBS	Biochrom
Tween 20, rein	Merck

### 2.2.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Produkt	Quelle
SDS-7B, vorgefärbt	Sigma
Protein-Ladder	Gibco
Rainbow Marker	Roth

### 2.2.3 Antikörper

Antigen	Quelle	Konjugation	Quelle	AK-Typ	Kat.-Nr.
Bax	Kaninchen		Santa-Cruz	N-20	sc-493
Bcl-x	Kaninchen		PharMingen		B22630
Cytochrom c	Maus		PharMingen	7H8.2C12	65981A
Phospho-Akt/PKB(Ser473)	Kaninchen		New England Biolab		#9271
Phospho-c-Jun(Ser63)	Kaninchen		New England Biolab		#9261
Phospho-ERK1/2(Tyr204)	Kaninchen		New England Biolab		#9101
Maus-IgG (H&L)	Esel	AP	Dianova		715-055-151
Kaninchen-IgG (H&L)	Ziege	AP	Tropix		AC31RT

### 2.2.4 Kontroll-Zelllysate

Antigen	Herkunft	Behandlung	Quelle	Kat.-Nr.
ERK1/2 / Phospho-ERK1/2	bakterielles Expressionssystem	MKK2	New England Biolabs	#9103
c-Jun / Phospho-c-Jun	NIH 3T3	UV-Bestrahlung	New England Biolabs	#9263
Akt/PKB / Phospho-Akt/PKB	NIH 3T3	PDGF	New England Biolabs	#9273

### 2.3 Plasmide

pGL3ti(SBE)<sub>4</sub> Jonk *et al.* (1998)  
Resistenz: Ampicillin  
Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von W. Kruijer (Haren, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

pRL-CMV Promega, Kat.-Nr. E2261  
Resistenz: Ampicillin

### 2.4 Bakterienstämme und Zelllinien

#### 2.4.1 E.Coli DH5 $\alpha$

Diesen für die Plasmid-Vermehrung geeigneten *E. Coli*-Stamm erhielten wir von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Jung in Tübingen.

#### 2.4.2 FTO-2B

Diese Rattenhepatomlinie leitet sich von der Reuber-Linie H35 ab (Deschatrette und Weiss, 1974; Killary und Fournier, 1984) und wurde uns freundlichst von Prof. Dr. Schütz aus Heidelberg überlassen.

#### 2.4.3 HepG2

Bei HepG2 handelt es sich um eine von der American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) bezogene, humane Hepatoblastomlinie.

#### 2.4.4 Jurkat J16 T-Zellen

Jurkat T-Zellen sind eine humane Thymocytenlinie, die wir dankenswerterweise von Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff erhielten.

#### 2.4.5 Wachstumsbedingungen der Zelllinien

Medien: **FTO-2B:** DMEM/Ham's F12, 10 % FCS, 1 %  $\frac{1}{10}$  Penicillin/Streptomycin.  
**HepG2:**  $\alpha$ MEM, 10 % FCS, 1 %  $\frac{1}{10}$  Penicillin/Streptomycin.  
**Jurkat J16 T-Zellen:** RPMI mit Glutamin, 10 % FCS,  
1 %  $\frac{1}{10}$  Penicillin/Streptomycin, 0.1 M HEPES pH7.4.

Passagieren: **FTO-2B:** Ein Mal pro Woche.  
**HepG2:** Ein Mal pro Woche.

Medienwechsel: **FTO-2B:** Ein Mal pro Woche.  
**HepG2:** Zwei Mal pro Woche.  
**Jurkat J16 T-Zellen:** Zwei Mal pro Woche.

Inkubation: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

## 2.5 Lösungen und Puffer

In diesem Kapitel werden Stammlösungen sowie diejenigen Puffer aufgeführt, die in mehreren verschiedenen Methodenteilen Verwendung fanden, die übrigen werden an der Stelle des Protokolls beschrieben, an der sie zum Einsatz kamen.

### 2.5.1 Stammlösungen

<u>Ampicillinlösung:</u>		100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei -20 °C)
<u>Aprotinin-Stammlösung:</u>	0.3 mM	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei -20 °C)
<u>APS-Lösung:</u>	10 % M/V	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei -20 °C)
<u>BCA-Proteintest, Reagenz B:</u>		4 % M/V CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(bei 4 °C)
<u>BSA-Stammlösung:</u>	10 % M/V	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei 4 °C)
<u>Dexamethasonlösung:</u>	10 µM	Stammlsg. 1:10 in PBS	(Lagerung bei -20 °C)
<u>Dexamethason-Stammlsg.:</u>	100 µM	39.3 µg/ml in EtOH	(Lagerung bei -20 °C)
<u>Dieldrinlösung:</u>	25 mM	9.52 mg/ml in DMSO	(Lagerung bei -20 °C)
<u>DTT-Stammlösung:</u>	100 mM	15.4 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei -20 °C)
<u>EDTA-Stammlösung:</u>	100 mM	37.2 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei 4 °C)
<u>EGTA-Stammlösung:</u>	100 mM	38.0 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , pH7.4	(Lagerung bei 4 °C)
<u>EGTA-Stammlösung:</u>	200 mM	76.1 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , pH7.4	(Lagerung bei 4 °C)
<u>HEPES-Stammlösung:</u>	0.5 M	119 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , pH7.5	(Lagerung bei -20 °C)
<u>Insulinlösung:</u>	100 µM	Stammlsg. 1:10 in PBS	(Lagerung bei -20 °C)
<u>Insulin-Stammlösung:</u>	1 mM	5.74 mg/ml in 10 % V/V HAC	(Lagerung bei -20 °C)
<u>KCl-Stammlösung:</u>	1 M	74.6 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei RT)
<u>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Stammlösung:</u>	0.5 M	68.0 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , pH 7.4 mit KOH	(bei 4 °C)
<u>KOH-Stammlösung:</u>	4 M	224.4 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei RT)
<u>Leupeptin-Stammlösung:</u>	10 mM	5 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei -20 °C)
<u>MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung:</u>	1 M	203 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei RT)
<u>MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung:</u>	1 M	246 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei RT)
<u>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Stammlösung:</u>	200 mM	36.8 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei -20 °C)
<u>NaF-Stammlösung:</u>	200 mM	8.4 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei 4 °C)
<u>Pepstatin-Stammlösung:</u>	1 mM	0.7 mg/ml in MeOH	(Lagerung bei -20 °C)
<u>Phenobarbitallösung:</u>	200 mM	46.4 mg/ml in PBS	(Lagerung bei 4 °C)
<u>PMSF-Stammlösung:</u>	100 mM	17.4 mg/ml in EtOH	(Lagerung bei -20 °C)
<u>SDS-Lösung:</u>	20 %	200 g/l in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei RT)
<u>Staurosporinlösung:</u>	0.8 mM	146 µg/ml in DMSO	(Lagerung bei -20 °C)
<u>hTGF-β1-Lösung:</u>	40 nM	1 µg/ml in 4 mM HCl, 1 % M/V BSA	(bei -20 °C)
<u>Tris-Stammlösung:</u>	500 mM	60.6 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei RT)
<u>Tris-Stammlösung:</u>	1.5 M	182 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	(Lagerung bei RT)

### 2.5.2 Puffer für die Mikrobiologie

#### LB-Medium:

- Die Lösung wurde auto-klaviert.
- Lagerung bei 4° C.

Substanz	Menge	Endkonz.
<i>Bacto tryptone</i>	10 g	1 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
<i>Bacto yeast extract</i>	5 g	0.5 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
NaCl	5 g	0.5 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
NaOH, 1 N	1 ml	
ad 1000 ml mit Aqua bidest.		

#### LB-Ampicillin-Medium:

- Lagerung bei 4° C.

Substanz	Menge	Endkonz.
LB-Medium	1 l	
Ampicillin, 0.1 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>	1 ml	100 <sup>µg</sup> / <sub>ml</sub>

#### LB-Agar:

- Die Lösung wurde auto-klaviert.
- Bei einer Temperatur von 50 °C wurden die Platten gegossen.
- Lagerung bei 4° C.

Substanz	Menge	Endkonz.
<i>Bacto tryptone</i>	10 g	1 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
<i>Bacto yeast extract</i>	5 g	0.5 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
NaCl	5 g	0.5 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
Bacto Agar	15 g	1.5 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
NaOH, 1 N	1 ml	
ad 1000 ml mit Aqua bidest.		

#### LB-Ampicillin-Agar:

- Zugabe von Ampicillin zum autoklavierten LB-Agar bei einer Temperatur von 50 °C.
- Lagerung bei 4° C.

Substanz	Menge	Endkonz.
LB-Agar, 50 °C	1 l	
Ampicillin, 0.1 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>	1 ml	100 <sup>µg</sup> / <sub>ml</sub>

### 2.5.3 Puffer für die Zellkultur

#### 10 x PBS (Phosphate)

##### Buffered Saline):

- Lagerung bei RT.

Substanz	Menge	Endkonz.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	51.1 g	50 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.0 g	
NaCl	87.0 g	150 mM
ad 1000 ml mit Aqua bidest.		

#### Wachstumsmedien:

Siehe Kap. 2.4.5 „Wachstumsbedingungen der Zelllinien“.

### 2.5.4 Puffer für die Molekularbiologie

#### HBS (HEPES Buffered

##### Saline):

- Die Lösung wurde sterilfiltriert.
- Lagerung bei 4° C.

Substanz	Menge	Endkonz.
HEPES	477 mg	20 mM
NaCl	877 mg	150 mM
NaOH, 4 M	auf pH 7.4	
ad 100 ml mit Aqua bidest.		

### 2.5.5 Puffer für die Biochemie

#### A-Puffer:

- Lagerung bei 4 °C oder bei -20 °C.

Substanz	Menge	Endkonz.
Saccharose	856 mg	250 mM
HEPES pH 7.5, 0.5 M	400 µl	20 mM
EGTA, 200 mM	50 µl	1 mM
EDTA, 100 mM	100 µl	1 mM
KCl, 1M	100 µl	10 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 1 M	15 µl	1.5 mM
DTT, 100 mM	100 µl	1 mM
Aprotinin, 2 <sup>mg</sup> / <sub>ml</sub>	10 µl	2 <sup>µg</sup> / <sub>ml</sub>
Leupeptin, 10 mM	10 µl	10 µM
Pepstatin, 1 mM	10 µl	1 µM
PMSF, 100 mM	100 µl	1 mM
10 ml Endvolumen mit aqua bidest.		

#### Homogenisierungspuffer:

- Lagerung bei 4 °C oder bei -20 °C.

Substanz	Menge	Endkonz.
Mannose	540 mg	300 mM
EDTA, 100 mM	100 µl	1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KOH pH 7.4, 0.5 M	200 µl	10 mM
Aprotinin, 2 <sup>mg</sup> / <sub>ml</sub>	10 µl	2 <sup>µg</sup> / <sub>ml</sub>
Leupeptin, 10 mM	10 µl	10 µM
Pepstatin, 1 mM	10 µl	1 µM
PMSF, 100 mM	100 µl	1 mM
10 ml Endvolumen mit aqua bidest.		

#### 2x Lämmli-Puffer:

- Nach Zugabe von Tris-Base und Glycerin wurde auf 75 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgefüllt und dann der pH mit 25 % HCl eingestellt.
- Lagerung bei -20 °C.

Substanz	Menge	Endkonz.
Tris/HCl pH 6.8	1.51 g	125 mM
Glycerin	20 ml	20 % <sup>V</sup> / <sub>V</sub>
SDS	4 g	4 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
2-Mercaptoethanol	10 ml	10 % <sup>V</sup> / <sub>V</sub>
Bromphenolblau	4 mg	0.004 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
ad 100 ml mit Aqua bidest.		

Propidiumiodid-Puffer:

- Lagerung bei 4°C.

Substanz	Menge	Endkonz.
Natriumcitrat-2H <sub>2</sub> O	50 mg	0.1 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
Triton X-100	50 µl	0.1 % <sup>V</sup> / <sub>V</sub>
Propidiumiodid, 10 <sup>mg</sup> / <sub>ml</sub>	250 µl	50 <sup>µg</sup> / <sub>ml</sub>
ad 50 ml mit Aqua bidest.		

RIPAm4a:

- Der pH wurde mit 25 % HCl eingestellt.
- Lagerung bei 4°C.

Substanz	Menge	Endkonz.
Tris/HCl pH 7.2	6.06 g	50 mM
NaCl	8.77 g	150 mM
SDS	1 g	0.1 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
Natriumdesoxycholat	5 g	0.5 % <sup>W</sup> / <sub>V</sub>
Triton X-100	10 ml	1.0 % <sup>V</sup> / <sub>V</sub>
Natriumpyrophosphat	4.46 g	10 mM
Natriumglycerolphosphat	5.40 g	25 mM
Natriumorthovanadat	368 mg	2 mM
EGTA, 100 mM	10 ml	1 mM
ad 1000 ml mit Aqua bidest.		

RIPAm4:

- Lagerung bei 4°C.
- Fünf Tage haltbar ohne PMSF.
- PMSF erst direkt vor Verwendung zusetzen.

Lösung	Teile	Endkonz.
RIPAm4a	1000	
NaF-Stammlösung	10	2 mM
Aprotinin-Stammlösung	1	0.3 µM
Leupeptin-Stammlösung	1	10 µM
Pepstatin-Stammlösung	1	1 µM
PMSF-Stammlösung	10	1 mM

10x TBS:

- Lagerung bei RT.

Substanz	Menge	Endkonz.
Tris/HCl pH 7.4	6.06 g	50 mM
NaCl	8.77 g	150 mM
ad 1000 ml mit Aqua bidest.		

**2.6 Reagenziensets**

Reagenzienset	Quelle
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
JetStar Maxi-Prep	Genomed
JetStar Midi-Prep	Genomed
JetStar Mini-Prep	Genomed



### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Herstellung kompetenter E.Coli DH5 $\alpha$

Dieses Protokoll nach Inoue *et al.* (1990) ist geeignet, um *E.Coli* für Transformationen hochkompetent zu machen. Bei diesem Protokoll ist es wichtig, daß nach der Vermehrungsphase der Zellen im Kühlraum gearbeitet wird und alle Gerätschaften gut gekühlt verwendet werden. In unseren Händen wurde dabei eine Transformationseffizienz von  $5 \cdot 10^8$  Transformanden pro Mikrogramm pUC18-DNA beobachtet.

- Aus einer Glycerin-Stammkultur wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agar angefertigt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
- 10 Klone wurden in 200 ml SOB-Medium überführt. Die Zellen ließ man im Schüttelinkubator bei 18 °C, 210 UpM bis zu einer Zelldichte von 450 mOD wachsen.

##### SOB-Medium

- Die Lösung wurde vor Zugabe der sterilfiltrierten  $MgCl_2$ -Lsg. autoklaviert.
- Lagerung bei 4°C.

Substanz	Menge	Endkonz.
<i>Bacto tryptone</i>	20 g	2 % $^{w/v}$
<i>Bacto yeast extract</i>	5 g	0.5 % $^{w/v}$
NaCl	500 mg	0.05 % $^{w/v}$
KCl, 1 M	2.5 ml	2.5 mM
NaOH	auf pH 7.4	
ad 1000 ml mit Aqua bidest.		
$MgCl_2$ , 1 M	10 ml	10 mM

- Die Zellsuspension wurde in vier 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert.
- Zentrifugation der Zellsuspension: 4 °C, 2000 g, 15 min (Megafuge 10 R).
- Resuspension der Zellen in je 4 ml TP-Puffer mit Hilfe einer 10 ml-Glaspipette. Danach wurden die Zellsuspensionen vereinigt.

##### TP-Puffer

- Die Lösung wurde sterilfiltriert.
- Lagerung bei 4°C.

Substanz	Menge	Endkonz.
PIPES	605 mg	10 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	441 mg	15 mM
KCl	3.73 g	250 mM
ad 150 ml mit Aqua bidest.		
KOH, 4 M	auf pH 6.7	
ad 200 ml mit Aqua bidest.		
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.12 g	55 mM

- Die Zellsuspension wurde vorsichtig auf Vortex geschwenkt. 12 ml DMSO wurden tropfenweise zugegeben (DMSO-Endkonzentration: 7 %). Danach wurde die Zellsuspension weitere 10 min auf Eis inkubiert.
- Die Zellsuspension wurde aliquotiert (200 µl) und schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die hochkompetenten *E.Coli* wurden dann bei -80 °C gelagert.

#### 3.1.2 Transformation von *E.Coli* per Hitzepuls

*Anmerkung:* Alle in dieser Arbeit erwähnten Plasmide trugen eine Ampicillin-Resistenz.

- Je ein Aliquot hochkompetenter *E.Coli* wurde in ein 13 ml-Bakterienröhrchen überführt.
- 75 pg DNA wurde zugegeben. Dann wurde kurz auf Vortex gemischt. Danach wurde 30 min auf Eis inkubiert.
- Ein Hitzepuls wurde appliziert, indem die Bakterienröhrchen exakt 45 sec in ein Wasserbad bei exakt 42 °C inkubiert wurden. Dann wurde mind. weitere 2 min auf Eis inkubiert.
- 50 µl dieser Zellsuspension wurden auf vorgewärmte LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C invertiert inkubiert.

#### 3.1.3 Ansetzen einer Glycerin-Stammkultur

- Eine einzelne Kolonie wurde von der LB-Ampicillin-Platte aus Kap. 3.1.2 in 3 ml LB-Ampicillin-Medium überführt. Eine Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (210 UpM).
- 500 µl der Übernachtkultur wurden in 10 ml LB-Ampicillin verdünnt. 500 µl dieser verdünnten Zellsuspension wurden mit 500 µl eines Glycerin-Puffers gut gemischt und bei -80 °C eingefroren.

##### Glycerin-Puffer

- Die Lösung wurde sterilfiltriert.
- Lagerung bei 4°C.

Substanz	Menge	Endkonz.
Glycerin	16.25 ml	65 % $\frac{V}{V}$
MgSO <sub>4</sub> , 1 M	2.5 ml	100 mM
Tris/HCl pH 8.0, 0.5 M	1.25 ml	25 mM
ad 25 ml mit Aqua bidest.		

Eine einmal angelegte Glycerin-Stammkultur sollte nicht mehr aufgetaut werden. Die Zellen wurden wieder in Kultur genommen, indem die gefrorene Stammkultur mit einer sterilen Pipettenspitze angekratzt und mit dieser dann das Kulturmedium angeimpft wurde.

### 3.1.4 Präparation von Plasmiden aus E.Coli

Plasmidpräparationen wurden mit JetStar Plasmid-Präparations-Kits der Firma Genomed durchgeführt. Der Vektor wurde anschließend in 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 8.5 aufgenommen und der DNA-Gehalt in einer Quarzküvette (Hellmax) durch die Extinktion bei 260 nm bestimmt ( $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g DNA}/\text{ml}$ ). Das Verhältnis der  $\text{OD}_{260}$  zu  $\text{OD}_{280}$  lag bei allen Präparationen zwischen 1.8 und 2.0.

### 3.2 Behandlung von Zellen in Kultur

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Induktion und zur Inhibition von Apoptose an Zellen *in vitro* durchgeführt. Die dabei zur Behandlung der Zellen eingesetzten Reagenzien faßt die folgende Tabelle zusammen:

Reagenz	Ausgangskonz.	Endkonz.	Eingesetzte Volumina
humanes TGF-β1	1 µg/ml	5 ng/ml	5 µl/ml Medium
Dexamethason	10 µM	10 nM	1 µl/ml Medium
Insulin	100 µM	100 nM	1 µl/ml Medium
Phenobarbital	200 mM	2 mM	10 µl/ml Medium
Dieldrin	25 mM	25 µM	1 µl/ml Medium

Die Behandlung der Zellen mit diesen Substanzen erfolgte bei den adhären wachsenden Zelllinien FTO-2B und HepG2 nach untenstehendem Protokoll, lediglich für die Reporteranalysen ergaben sich experimentell bedingt Abweichungen hiervon, auf die an entsprechender Stelle eingegangen wird.

Für unterschiedlich große Kulturschalen wurden unterschiedliche Volumina an Medium und eine jeweils andere Zahl an Zellen ausgesät:

Kulturschale	Medium [ml]	Zahl der ausgesäten Zellen	
		FTO-2B	HepG2
10 cm Durchmesser	10	$2.5 \cdot 10^6$	
6 cm Durchmesser	4	$1 \cdot 10^6$	
3.5 cm Durchmesser	1.5	$4 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$
„6-well“-Platte	1.5	$4 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$
„24-well“-Platte	1	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$

Die Zellbehandlung wurde wie folgt durchgeführt:

- Aussaat der Zellen und Inkubation: 24 h für FTO-2B und 48 h für HepG2.
- Der Zellrasen wurde mit sterilem PBS gewaschen und jeweils das genaue Volumen an Medium zugegeben.
- Mind. 15 min Inkubation der Schalen im Brutschrank.
- Die Schalen wurden schräggestellt, so daß das Medium auf einer Seite zusammenlief. Zugabe der Reagenzien oder des Lösungsmittels, wobei die Substanz bereits beim Pipettieren möglichst weit verteilt wurde und möglichst dort zugegeben wurde, wo das

Medium am höchsten über den Zellen stand. Anschließend wurde die Schale geschwenkt, um die Substanz gleichmäßig im Medium zu verteilen.

- Inkubation im Brutschrank bis zur Zellaufarbeitung.

### **3.3 Zellaufarbeitung zum Nachweis von Bax, Bcl-x<sub>L</sub>, Phospho-Akt/PKB, Phospho-c-Jun und Phospho-ERK im Western-Blot**

#### **3.3.1 Zellyse**

In dieser Arbeit wurde per Western-Blot u.a. der Phosphorylierungsstatus von Proteinen untersucht. Unter Streßsituationen, wie sie die Aufarbeitung der Zellen darstellt, kann es zur schnellen Aktivierung von Signalkaskaden mit ihren Kinasen und Phosphatasen kommen. Dies hätte den Phosphorylierungsstatus der Proteine in unerwünschter Weise verändert. Um dies zu verhindern, wurde die Aufarbeitung der Zellen möglichst auf Eis durchgeführt, und der Lysepuffer wurde mit einer Reihe von Kinase- und Phosphataseinhibitoren versehen.

- Aussaat der Zellen in eine 10 cm-Schale und Inkubation erfolgte wie unter Kap. 3.2 beschrieben.
- Pro Schale wurden 200 µl RIPAm4 ohne PMSF aus RIPAM4a vorbereitet. Erst direkt vor der Aufarbeitung wurde PMSF zugegeben.
- Der Zellrasen wurde zweimal mit kalter PBS gewaschen.
- 200 µl RIPAm4 wurden auf die Zellen pipettiert und mit einem Zellschaber schnell und gut verteilt, bis sich die Zellen von der Unterlage abgelöst hatten.
- Die Proben wurden 45 sec lang auf Eis mit Ultraschall (Labsonic 2000) bei einem „output“ von -0.042 mit kleiner Sonde homogenisiert.
- 15 min Zentrifugation bei 12000 UpM (ca. 10000 g) und 4 °C (Mikro RapidK).
- Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.2 Proteinbestimmung nach der BCA-Methode**

Die BCA-Methode der Proteinbestimmung (Smith *et al.*, 1985) ist gegenüber Störungen durch Detergenzien weniger anfällig als die nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1979; Smith *et al.*, 1985) und war daher die Methode der Wahl. Sie wurde wie folgt durchgeführt:

- Herstellung der BCA-Arbeitslösung: Für jede Probe wurden 750 µl benötigt.

BCA-Proteintest. Reagenz B: 4 % CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (Lagerung bei 4°C)

BCA-Arbeitslösung: Reagenz B mit Reagenz A (Pierce) 1:50 verdünnen.

- Die Proben wurden 1:25 in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt. Je 37.5 µl eines BSA-Proteinstandards (0 – 250 µg/ml) bzw. der verdünnten Proben wurden zu je 750 µl BCA-Arbeitslösung pipettiert und auf Vortex gemischt.
- Inkubation 1 h lang bei 60 °C in einem Thermoblock (IDL).
- Nach Abkühlung der Proben auf RT wurde die Absorption im Spektralphotometer (Pharmacia) bei 562 nm gemessen.
- Da sowohl die BCA-Färbereaktion als auch die Lowry-Proteinbestimmung auf der Biuret-Reaktion beruhen (Peterson, 1979; Smith *et al.*, 1985), konnte zur Berechnung des Proteingehalts eine für die Lowry-Proteinbestimmung vorgeschlagene Ausgleichsfunktion (Bates und McAllister, 1974) mit guten Ergebnissen angewandt werden:

$$E = a + b \cdot \ln(P + c)$$

E: Extinktion  
P: Proteinkonzentration  
a, b, c: Parameter

Zur Bestimmung der Parameter wurde in Origin V3.5 (Microcal) eine numerische Näherung mit den Startwerten a = -10000, b = 3750, c = 350 durchgeführt. Mit Hilfe der Umkehrfunktion:

$$P = e^{\frac{E-a}{b}} - c$$

konnten dann die Proteinwerte berechnet werden.

### 3.4 **Mitochondrienisolierung und Cytosolgewinnung**

Zur Untersuchung der Freisetzung von Cytochrom c im Western-Blot wurden zunächst eine Mitochondrien- und eine Cytosolfraktion isoliert. Dabei war zu beachten, daß Mitochondrien sehr empfindliche Zellorganellen sind. Daher erforderte ihre Isolierung in intakter Form höchste Sorgfalt. So mußten sämtliche verwendete Geräte und Lösungen auf Eis gekühlt sein.

Mit Hilfe der Sedimentationskoeffizienten der abzutrennenden Partikel ließ sich berechnen, wie die Zentrifugationsbedingungen zu wählen waren, um diese in einem Zentrifugationsschritt abzutrennen. Die Zentrifugationsbedingungen wurden so gewählt, daß im ersten Zentrifugationsschritt Partikel mit einem Sedimentationskoeffizienten von mehr als etwa  $9 \cdot 10^5$  Svedberg und im zweiten solche mit einem Sedimentationskoeffizienten von mehr als etwa 4500 Svedberg abgetrennt wurden. Hierdurch sollten im ersten Zentrifugationsschritt Kerne, Zellbruchstücke und nicht homogenisierte Zellen, im zweiten die Mitochondrien vom Cytosol abgetrennt werden.

### **3.4.1 Zellfraktionierung**

#### **3.4.1.1 Zellfraktionierung von FTO-2B**

- Direkt vor der Isolierung wurde Homogenisierungspuffer nach Boutry und Briquet (1982), leicht modifiziert, durch Zugabe von PMSF fertiggestellt, gut gemischt und auf Eis gestellt.
- Der Zellrasen wurde ein Mal mit kaltem PBS gewaschen und das verbliebene PBS gut mit einer Finnpipette abgezogen.
- 500 µl Homogenisierungspuffer wurden auf die Zellen pipettiert.
- Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Unterlage möglichst vorsichtig und zügig abgelöst.
- Die Zellsuspension wurde in einen konischen 1 ml-Homogenisator (Wheaton) überführt. Die Homogenisierung erfolgte auf Eis mit 50 Pistill-Stößen bei 100 UpM. Dabei war zu beachten, daß möglichst keine Luft untergemischt wurde und das Pistill so wenig wie möglich direkten Kontakt mit den Homogenisatorwänden bekam. Das verwendete Teflon-Pistill war um einige Mikrometer abgeschliffen worden, um den Spalt zwischen Gefäßwand und Pistill zu vergrößern und um damit eine schonendere Aufarbeitung zu ermöglichen.
- Das Homogenat wurde in ein kaltes 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Direkt im Anschluß wurde die differentielle Zentrifugation durchgeführt.

Um keine apoptotischen Zellen zu verlieren, die sich von der Unterlage abgelöst hatten, wurde bei Vorliegen von apoptotischen Zellen außerdem wie folgt vorgegangen:

- Das dekantierte Medium und das Wasch-PBS wurden gemeinsam bei 1200 g (2380 UpM, Minifuge T), 4 °C, 5 min zentrifugiert.
- Der Überstand wurde dekantiert, und das Zellpellet wurde mit der von der Zellkulturschale gewonnenen Zellsuspension aufgenommen.

#### **Differentielle Zentrifugation**

- Zur differentiellen Zentrifugation wurde das Zellhomogenat mit einer Pasteurpipette in ein 1.5 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit Homogenisierungspuffer auf ein Endvolumen von 1.3 ml gebracht.
- Die Zentrifugation erfolgte mit relativer Pelletiereffizienz  $k \approx 15000$ , 1 min lang bei 2 °C (Rotor A12-11: 2100 rpm, ~430 g): Entfernen der Kerne und der Zelltrümmer.

- Der Überstand wurde in ein 1.5 ml-Röhrchen überführt, mit Homogenisierungspuffer auf ein Volumen von 1.3 ml gebracht und mit relativer Pelletiereffizienz  $k \approx 700$ , 11 min lang bei 2 °C zentrifugiert (Rotor A12-11: 10000 UpM, ~10000 g): Sedimentieren der Mitochondrien.
- Der Überstand wurde abgenommen, in ein frisches Reaktionsröhrchen überführt und wird im folgenden als „Cytosol“ bezeichnet. Dieses Röhrchen und der Niederschlag aus der vorhergehenden Zentrifugation („Mitochondrien“) wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.4.1.2 Zellfraktionierung von Jurkat J16 T-Zellen

Jurkat J16-T-Zellen dienten in diesem Versuchsabschnitt als Positivkontrolle für eine Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien, wie sie nach Staurosporin-Behandlung beschrieben wurde (u.a. Bossy-Wetzel *et al.*, 1998).

Für diese in Suspensionszellkultur gehaltene Zelllinie galt eine andere Versuchsvorschrift zur Behandlung und zur Aufarbeitung als für die adhärent wachsende Zelllinie FTO-2B (nach einer persönlichen Mitteilung von Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff, Tübingen):

- Zellen wurden im Falcon-Zentrifugationsröhrchen vorsichtig aufgeschüttelt. Direkt im Anschluß wurde ein 10 µl-Aliquot der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt und dessen Zellkonzentration bestimmt.
- Die erforderliche Zellkonzentration wurde durch Zugabe von frischem Medium eingestellt und die Zellen wurden anschließend in eine 3.5 cm-Schale ausgesät:

Gesamtzellzahl pro Schale	$1 \cdot 10^7$
Medium pro Schale [ml]	1.5

- Vor der Zellbehandlung wurden die Zellen mind. 15 min im Brutschrank inkubiert.
- Zugabe von  $3.125 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml Medium}}$  Staurosporin-Lösung (Endkonzentration 2.5 µM) bzw. von DMSO (Lösungsmittelkontrolle) und Mischen des Mediums durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschale.
- Inkubation der Zellen bis zu ihrer Aufarbeitung im Brutschrank.
- Nach der Inkubation wurden die Zellen in einem Zentrifugationsröhrchen bei 300 g, 5 min, 4 °C abzentrifugiert (Minifuge T), der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 2 ml kalter PBS durch Schütteln auf Vortex resuspendiert.
- Die Zellen wurden abermals zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C) und nach Verwerfen des Überstandes in 400 µl A-Puffer (Labor Prof. Schulze-Osthoff, persönliche Mitteilung) mit einer 1000 µl-Pipettenspitze resuspendiert und auf Vortex gemischt.

- Homogenisierung der Zellen mit einem 0.5 ml-Homogenisator (Wheaton) auf Eis bei 1000 UpM mit 40 Pistillstößen, wobei es das bereits in Kap. 3.4.1.1 Erwähnte zu beachten galt.

#### **Differentielle Zentrifugation**

- Das Homogenat wurde mit einer Pasteurpipette in ein 600 µl-Röhrchen überführt. In einem ersten Zentrifugationsschritt wurden Zelltrümmer und Kerne entfernt: im A12-11-Rotor 2000 UpM, 1 min, 2 °C (Pelletiereffizienz  $k \approx 15000$ ,  $g \approx 400$ ).
- Aus dem Überstand, der in ein frisches 600 µl-Röhrchen überführt wurde, wurden die Mitochondrien pelletiert: 9000 UpM, 10 min, 2 °C im A12-11-Rotor (Pelletiereffizienz  $k \approx 750$ ,  $g \approx 8000$ ).
- Der Überstand wurde abgenommen, in ein frisches Reaktionsröhrchen überführt und wird im folgenden als „Cytosol“ bezeichnet. Dieses Röhrchen und der Niederschlag aus der vorhergehenden Zentrifugation („Mitochondrien“) wurden bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) stellt eine einfache, schnelle und sensitive Methode dar. Im Extinktionsbereich bis 400 mOD<sub>595</sub> konnten die Extinktionswerte einer Eichreihe mit einer Regressionsgerade gut beschrieben werden. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, deren Mittelwert zur Berechnung des Proteingehaltes verwendet wurde. Zur Aufnahme einer Eichreihe wurden BSA-Standards mit einer Konzentration von bis zu 200 µg/ml in Homogenisierungspuffer angesetzt. Die Messung wurde wie folgt durchgeführt:

- Mind. 10 min vor der Messung wurde das Spektralphotometer eingeschaltet und auf die zu messende Wellenlänge von 595 nm eingestellt.
- Je 20 µl eines Proteinstandards oder einer Probe wurden mit je 1 ml Bradford-Arbeitslösung gemischt.

Bradford-Arbeitslösung: 1 Teil Bradford-Reagenz mit 4 Teilen H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnen, mit Whatman-Papier filtrieren, etwa zwei Wochen haltbar.

- Bei RT wurde 5 - 60 min inkubiert.
- Messung im Spektralphotometer unter Verwendung von Einweg-Halbmikroküvetten.

### **3.5 Western-Blotting**

#### **3.5.1 Probenvorbereitung**

Die Probenvorbereitung der Proben mit Lämmli-Puffer bewirkt eine Denaturierung der Proteine durch Spaltung von Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol und durch das Anlagern von SDS. Letzteres bewirkt außerdem, daß sich ein SDS/Protein-Komplex bildet, der für alle Proteine ein etwa gleiches Masse-Ladungs-Verhältnis aufweist. Das hat zur Folge, daß der Komplex im anschließenden Gellauf nur in Abhängigkeit von der Größe des Proteins durch das Gelnetz wandert.

Es sollte an dieser Stelle soviel Lysat wie möglich mit Lämmli-Puffer gemischt werden, da eine spätere Aufarbeitung wegen der Bildung eines Niederschlages in den Lysaten nicht mehr quantitativ möglich ist.

- Proben wurden so mit RIPAm4 verdünnt, daß sie den gleichen Proteingehalt aufwiesen.
- Die verdünnten Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x Lämmli-Puffer verdünnt.
- Die Proben wurden 5 min bei 95 °C inkubiert, kurz gründlich gemischt, nach dem Abkühlen kurz abzentrifugiert und erneut gemischt.
- Mit Markerproteinen wurde den Angaben des Herstellers entsprechend verfahren.

Mit Lämmli-Puffer versetzte Lysate konnten bei -20 °C mehrere Monate lang gelagert werden und mußten vor dem Probenauftrag erneut erhitzt und gemischt werden.

#### **3.5.2 Proteinkonzentrierung**

Im Cytosol der Zelllinie FTO-2B und Jurkat J16 reichte der Proteingehalt an Cytochrom c zunächst nicht aus, um im Western-Blot nachweisbar zu sein. In diesen Fällen wurde zuvor eine Proteinkonzentrierung per Ultrafiltration durchgeführt:

- Das der gewünschten Proteinmenge entsprechende Probenvolumen wurde in den Probenbehälter der Ultrazentrifugationseinheit (Amicon) pipettiert und mit Puffer auf ein für alle Proben gleiches Volumen gebracht.
- Zentrifugation der Proben mit 14000 g, 20 °C im Festwinkelrotor F45-30-11, bis im Probenbehälter ein Restvolumen von ca. 50 µl erreicht war.
- Die Proben werden 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer gemischt und wie in Kap. 3.5.1 beschrieben für den Western-Blot vorbereitet.

### 3.5.3 Gelgießen zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

- Nach folgendem Pipettierschema wurden Acrylamidlösungen hergestellt (Angaben pro 10 ml Endvolumen):

Acrylamid-Konz. [%]	4 (Sammelgel)	10	13.5	15	17.5
30%-Acrylamid (Roth) [ml]	1.33	3.3	4.5	5	5.8
1.5 M Tris/HCl pH 8.9 [ml]		2.5	2.5	2.5	2.5
0.5 M Tris/HCl pH 6.8 [ml]	2.5				
H <sub>2</sub> O bidest. [ml]	6.04	4.04	2.84	2.34	1.54
20 % SDS [µl]	50	50	50	50	50
10 % APS [µl]	100	100	100	100	100
TEMED [µl]	10	10	10	10	10
Verwendet für [Antigen]:		P-Akt/PKB P-c-Jun P-ERK	Bcl-x	Bax	Cyt.c

- Die Polymerisation des Trenngels wurde mit APS und TEMED gestartet, dann wurde durch Schwenken oder Rühren gemischt und die Lösung zwischen die mit Abstandshaltern getrennten Glasplatten eingefüllt. Die Lösung wurde mit Isopropanol überschichtet.
- Nach 60 min Inkubation, in denen das Gel auspolymerisierte, wurde Isopropanol abgegossen, das einige Sekunden benötigte um abzulaufen.
- Die Polymerisation des Sammelgels wurde mit APS und TEMED gestartet. Die Gellösung wurde kurz durch Schwenken gemischt und zwischen die Glasplatten gegeben. Ein Teflonkamm wurde zwischen die Glasplatten in das Sammelgel geschoben. Die Polymerisation erfolgte mindestens 60 min bei RT.

### 3.5.4 Probenauftrag und Gellauf

- Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und Laufpuffer wurde eingefüllt.

#### 10x SDS-PAGE Laufpuffer:

- Der pH von 8.3 mußte nicht eingestellt werden.
- Lagerung bei RT.

Substanz	Menge	Endkonz.
Tris-Base	30.0 g	248 mM
Glycin	144 g	1.92 M
SDS	10.0 g	1 % <sup>w/v</sup>
ad 1000 ml mit Aqua bidest.		

- Der Teflonkamm und die Geltaschen wurden mit Laufpuffer gespült.

- Die vorbereiteten Proben (Kap. 3.5.1) wurden vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Dabei wurden die folgenden Proteinmengen aufgetragen:

Antigen	Quelle	Fraktion	Protein [ $\mu\text{g}$ ]
Bax	FTO-2B	Gesamtzellhomogenat	1
Bcl-x	FTO-2B	Gesamtzellhomogenat	1
Cyt.c	FTO-2B	Cytosol	150
		Mitochondrien	20 % <sup>*)</sup>
	Jurkat J16	Cytosol	150
		Mitochondrien	10 % <sup>*)</sup>
P-Akt/PKB	FTO-2B	Gesamtzellhomogenat	20
P-c-Jun	FTO-2B	Gesamtzellhomogenat	20
P-ERK	FTO-2B	Gesamtzellhomogenat	40

<sup>\*)</sup> Es wurde keine Proteinbestimmung der Mitochondrien-Fraktion durchgeführt. Angegeben ist hier der Bruchteil desjenigen Anteils an der gesamten Fraktion, der von der Cytosol-Fraktion eingesetzt wurde.

- Für den Gellauf wurden folgende Bedingungen gewählt:

	Minigel	Normalgel
<b>Spannung [V]</b>	200	200
<b>Dauer [min]</b>	ca. 60	ca. 180

- Der Gellauf wurde gestoppt, als die Bromphenolblaubande etwa 5 cm gelaufen war.

### 3.5.5 Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid-Membran

Bei allen Schritten, bei denen die Membran bearbeitet wurde, wurde mit Handschuhen und Pinzette gearbeitet, um die Membran nicht mit Fremdprotein zu verunreinigen.

- Der Transfer wurde in einem Kühlkabinett bei 4 °C durchgeführt.
- Die PVDF-Membran (Millipore) wurde mit Kugelschreiber beschriftet, kurz in Methanol angefeuchtet, wobei lösliche Anteile der Beschriftung unter Schwenken abgespült wurden und in Transfer-Puffer mind. 10 min lang geschüttelt.

#### Transferpuffer:

- Der pH von 8.3 mußte nicht eingestellt werden.
- Lagerung bei RT oder bei 4 °C.
- Vor dem Transfer wurde der Puffer auf 4 °C abgekühlt.

Substanz	Menge	Endkonz.
Tris-Base	9.01 g	24.8 mM
Glycin	43.24 g	192 mM
Methanol	600 ml	20 % $\text{V}/\text{V}$
ad 3000 ml mit Aqua bidest.		

- Nach dem Gellauf wurden eine Glasplatte und das Sammelgel entfernt und das Gel wurde zweimal 5 min in Transfer-Puffer gespült.
- Die Membran wurde zwischen zwei Whatman 3 MM Filterpapiere auf das Gel gelegt. Luftblasen wurden vorsichtig entfernt. Diese Anordnung wurde so zwischen zwei Schwämme in die Gelhalterung und dann in die Transferkammer (BioRad) eingelegt, daß die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigte.
- Der Transfer erfolgte bei 100 mA unter Rühren bei 4 °C über 12 h.
- Die Membran wurde an der Luft bei RT getrocknet.

### 3.5.6 Antikörper-Inkubation

- Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, mußte die Membran zunächst eine Stunde bei RT in Blockierungspuffer inkubiert werden, dessen Zusammensetzung vom nachzuweisenden Antigen abhängig war:

Blockierungspuffer:

Puffer/Substanz	Antigen	Menge	Endkonzentration
1x PBS	Bax Bcl-x	1000 ml	
1x TBS	Cyt.c P-Akt/PKB P-c-Jun P-ERK	1000 ml	
Tween 20	Bax	2 ml	0.1 % $\frac{V}{V}$
	Bcl-x	2 ml	0.1 % $\frac{V}{V}$
	Cyt.c	1 ml	0.05 % $\frac{V}{V}$
	P-Akt/PKB	2 ml	0.1 % $\frac{V}{V}$
	P-c-Jun	2 ml	0.1 % $\frac{V}{V}$
	P-ERK	2 ml	0.1 % $\frac{V}{V}$
I-Block	Bax	13.3 g	0.66 % $\frac{W}{V}$
	Bcl-x	13.3 g	0.66 % $\frac{W}{V}$
BSA	Cyt.c	40 g	2 % $\frac{W}{V}$
Milchpulver	P-Akt/PKB	100 g	5 % $\frac{W}{V}$
	P-c-Jun		
	P-ERK		
Natriumazid	alle	400 mg	0.02 % $\frac{W}{V}$

- Die getrocknete Membran wurde zunächst in wenig Methanol befeuchtet und anschließend mit Blockierungspuffer zweimal 5 min inkubiert, um Methanol zu entfernen.
- Die Membran wurde 1 h lang bei RT unter Schwenken in Blockierungspuffer inkubiert.

- Der Primärantikörper wurde in folgenden Konzentrationen in Blockierungspuffer angesetzt, und die blockierte Membran wurde bei der angegebenen Temperatur und für die angegebene Dauer inkubiert:

Antigen	Primärantikörper	Inkubationsbedingungen	
		Temperatur	Dauer
<b>Bax</b>	1:1000	RT	1 h
<b>Bcl-x</b>	1:1000	RT	1 h
<b>Cyt.c</b>	1:1000	4 °C	über Nacht
<b>P-Akt/PKB</b>	1:1000	4 °C	über Nacht
<b>P-c-Jun</b>	1:500	4 °C	über Nacht
<b>P-ERK</b>	1:500	4 °C	über Nacht

- Für den nachfolgenden Waschschrift wurde der oben angegebene Blockierungspuffer verwendet. Lediglich für den Nachweis von Cytochrom c ergab sich ein anderes Protokoll: Hier wurde bei allen nachfolgenden Schritten BSA weggelassen. Bei allen Nachweisen wurde zweimal kurz und zweimal 5 min mit Blockierungspuffer bei RT gewaschen.
- Der Sekundärantikörper wurde in Blockierungspuffer verdünnt und die Membran mit diesem wie angegeben inkubiert:

Antigen	Sekundärantikörper	Inkubationsbedingungen	
		Temperatur	Dauer
<b>Bax</b>	1:10000	RT	1 h
<b>Bcl-x</b>	1:10000	RT	1 h
<b>Cyt.c</b>	1:3000	RT	1 h
<b>P-Akt/PKB</b>	1:5000	RT	2.5 h
<b>P-c-Jun</b>	1:1500	RT	1 h
<b>P-ERK</b>	1:1500	RT	1 h

- Es wurde mit Blockierungspuffer gewaschen: dreimal kurz und dreimal 5 min lang bei RT. Direkt im Anschluß erfolgte der Nachweis der Antikörperbindung mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion.

### 3.5.7 Chemilumineszenz-Reaktion

Die Aufnahme des Chemilumineszenz-Signals erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit einer CCD-Kamera, die in einer lichtabgeschlossenen Aufnahmekammer montiert war. Bei einer CCD-Kamera sind photosensitive Elemente, die einer Optik nachgeschaltet sind, in der Lage, auch noch einzelne Lichtquanten zu detektieren. Die Zahl der aufgenommenen Lichtquanten konnte von einem angeschlossenen Computer ausgelesen werden. Diese Information wurde in Form von Graustufen dargestellt und gespeichert, wobei eine lineare Beziehung zwischen Graustufenwert und der Zahl der Lichtquanten bestand.

Die Umsetzung von CDP-Star (Tropix) durch Alkalische Phosphatase erzeugte die gemessene Chemilumineszenz. CDP-Star ist ein Phosphorsäureester eines 1,2-Dioxetans und zerfällt nach Hydrolyse der Phosphorsäureestergruppe durch Alkalische Phosphatase zu einem Produkt mit einem angeregten Elektronenzustand. Im

Zuge der Inaktivierung dieses Produktes wird ein Lichtquant ausgesendet, das detektiert werden kann.

Nitro-Block II (Tropix) ist ein Chemilumineszenzverstärker, der für die Verwendung mit Nitrocellulose- und PVDF-Membranen entwickelt wurde. Nitro-Block II erzeugte eine hydrophobe Umgebung an der Membranoberfläche und verstärkte auf diese Weise die Chemilumineszenz.

- Die Membran wurde zweimal je 2 min lang in Assay-Buffer äquilibriert.

10x Assay-Buffer:

- Nach Zugabe der Tris-Base wurde mit 25 % HCl der pH auf 9.8 eingestellt.
- Lagerung bei 4 °C.

Substanz	Menge	Endkonz.
Tris-Base	1.21 g	200 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	102 mg	10 mM
ad 50 ml mit Aqua bidest.		

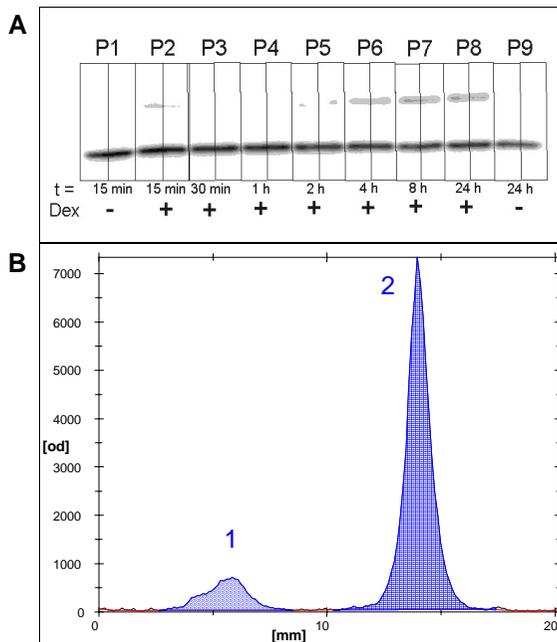
- 3 ml CDP-Star-Substratlösung wurden pro 100 cm<sup>2</sup>-Membranfläche vorbereitet, wobei Nitro-Block II zu CDP-Star *ready to use* (Tropix) zugegeben wurde:

Antigen	Anteil von Nitro-Block II
Bax, Bcl-x, Cytochrom c	1:20
P-Akt/PKB, P-c-Jun und P-ERK	1:10

- Assay-Buffer ließ man von der Membran ablaufen. Die vorbereitete Substratlösung wurde auf die Membran aufgetragen und gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt, wobei Luftblasen vermieden wurden.
- 5 min Inkubation bei RT, wobei darauf geachtet wurde, daß das Substrat gleichmäßig auf der Membran verteilt blieb.
- Die Substratlösung ließ man von der Membran ablaufen. Die Membran wurde in Klarsichthülle gelegt, überschüssige Substratlösung wurde vorsichtig mit Kimwipes abgestrichen.
- Bis zur Aufnahme des Signals wurde mind. 10 min gewartet, damit sich eine stärkere Chemilumineszenz entwickeln konnte, die ihr Maximum nach ca. 45 – 60 min erreichte.
- Um die Lage der Banden von Markerproteinen und Proben vergleichen zu können, wurde zunächst bei Auflicht ein Bild von der Membran aufgenommen.
- Zur Aufnahme der Chemilumineszenz wurde die Aufnahmekammer geschlossen. Die Aufnahme erfolgte bei voll geöffneter Blende. Die Aufnahmedauer wurde so eingestellt, daß der dynamische Bereich der CCD-Kamera möglichst gut ausgenutzt wurde.
- Das aufgenommene Bild wurde im TIFF-Format gespeichert und konnte mit der Software TINA ausgewertet werden.

### 3.5.8 Auswertung der Chemilumineszenzdaten

Zur Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale wurde das abgespeicherte TIFF-Bild aus Kap. 3.5.7 mit TINA V2.09a ausgewertet. Dabei wurde in Laufrichtung der Proben für jede Probe ein Profil festgelegt (Abb. 3-1A). Die Signale dieses Profils wurden in Form eines x-y-Diagramms dargestellt. In diesem Diagramm konnten der Hintergrund durch unspezifische Signale sowie der Bereich der Antigen-spezifischen Bande festgelegt werden (Abb. 3-1B). TINA integriert das Signal über dem Hintergrund im Bereich der spezifischen Bande und gibt das Ergebnis als Zahlenwert in willkürlicher Einheit aus.



**Abbildung 3-1: Auswertung der Chemilumineszenzdaten. A: Darstellung der Originaldaten und der Auswertungsprofile im Bild.** Die Profile P1 bis P9 wurden so definiert, daß sie den relevanten Bereich des TIFF-Bildes für jede einzelne Probe umfaßten. Unter dem Profil ist die Behandlung der Probe angegeben. **B: x-y-Diagramm eines Auswertungsprofils.** Auf der x-Achse ist die Entfernung vom Start des Profils (in Abb. 3-1A jeweils oben) aufgetragen, auf der y-Achse die senkrecht zum Profilverlauf integrierten Chemilumineszenzdaten. Rot: Die Grenze des hier sehr schwachen, unspezifischen Hintergrundsignals. Blau umrandete Flächen: Flächen zweier spezifischer Chemilumineszenzsignale, von denen nur das mit "2" bezeichnete vom spezifischen Antigen herrührte. Abkürzungen: Dex: Dexamethason; od: optical density; t: time.

### 3.6 TGF- $\beta$ -Reportergenanalyse

Das „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ von Promega ermöglicht die Messung von zwei unterschiedlichen Luciferase-Aktivitäten im gleichen Reaktionsansatz, nämlich die des Glühwürmchen- (*firefly*)-Enzyms und die des Seescheide- (*Renilla reniformis*)-Enzyms. Zur Reportergenanalyse wurde eine Doppeltransfektion der Zellen durchgeführt: Das eine Plasmid mit dem zu untersuchenden Promoterelement enthielt das Gen der *firefly*-Luciferase, das andere enthielt das Gen der *Renilla*-Luciferase unter Kontrolle eines nicht regulierten Promotors. Dadurch lag mit der Aktivität der *Renilla*-Luciferase ein Maß für die Transfektionseffizienz und für die allgemeine Transkriptionsstärke in jeder einzelnen Probe vor, und die Aktivität der *Renilla*-Luciferase konnte zum Abgleich der jeweiligen *firefly*-Luciferase-Aktivität herangezogen werden.

Da die Einzelmeßergebnisse erfahrungsgemäß recht stark schwanken, wurden für jedes Einzelexperiment sechs unabhängige Transfektionen und Luciferase-Messungen durchgeführt, deren Median als Ergebnis des Einzelperiments verwendet wurde.

#### 3.6.1 Transfektion mit Reportergen-Plasmiden

Als Reportergenplasmid diente in dieser Untersuchung das Plasmid pGL3ti-(SBE)<sub>4</sub> (Jonk *et al.*, 1998), das in mehrfacher Kopie das *Smad-binding-element* (SBE; Jonk *et al.*, 1998) enthält und daher eine TGF- $\beta$ -spezifische Transaktivierung des nachgeschalteten *firefly*-Luciferase-Gens zeigte.

Zum Abgleich der *firefly*-Luciferase-Aktivität wurde das Plasmid pRL-CMV (Promega) verwendet, der das *Renilla*-Luciferasegen unter der Kontrolle des *immediate early gene*-Promotors des Cytomegalie-Virus (CMV) enthielt.

- Aussaat der Zellen in eine 24-well-Platte und Inkubation wie unter 3.2 beschrieben.
- Ansetzen des Transfektionsreagenz:
  - Pro 1 ml Medium wurden 20  $\mu$ l DNA-Lösung und 20  $\mu$ l Unifectin M-Lösung angesetzt. Für FTO-2-Zellen galt:

Lösung	DNA-Lösung			Unifectin M-Lösung	
	pGL3ti-(SBE) <sub>4</sub> 1.25 mg/ml	pRL-CMV 0.05 mg/ml	HBS	Unifectin-M 1 mg/ml	HBS
Volumen	1.60 $\mu$ l/ml	0.1 $\mu$ l/ml	18.3 $\mu$ l/ml	12.03 $\mu$ l/ml	7.97 $\mu$ l/ml
Endkonz.	2000 ng/ml	5 ng/ml		6 $\mu$ g/ $\mu$ g DNA	

Für HepG2-Zellen galt:

Lösung	DNA-Lösung			Unifectin M-Lösung	
	pGL3ti-(SBE) <sub>4</sub> 1.25 mg/ml	pRL-CMV 0.05 mg/ml	HBS	Unifectin-M 1 mg/ml	HBS
Volumen	0.72 $\mu$ l/ml	0.1 $\mu$ l/ml	19.2 $\mu$ l/ml	4.07 $\mu$ l/ml	15.93 $\mu$ l/ml
Endkonz.	900 ng/ml	5 ng/ml		4.5 $\mu$ g/ $\mu$ g DNA	

- Die DNA-Lösung wurde langsam zur Unifectin M-Lösung gegeben und sehr vorsichtig gemischt. Dann wurde 15 min bei RT inkubiert.
- Erneut vorsichtiges Mischen des Transfektionsreagenzes und Zugabe von 40  $\mu$ l desselben auf 1 ml Medium. Transfektionsreagenz und Medium wurden durch vorsichtiges Schwenken der 24-*well*-Platte gemischt.
- Inkubation der Zellen 16 h lang im Brutschrank.

### 3.6.2 Zellbehandlung und Zellyse

- Waschen des Zellrasens mit PBS und Zugabe von je 1 ml Medium, dem die jeweiligen Reagenzien zugemischt worden waren (siehe Kap. 3.2).
- Inkubation im Brutschrank: 8 h bei FTO-2B- und 24 h bei HepG2-Zellen.
- Der Zellrasen wurde 1x mit PBS gewaschen. 100  $\mu$ l PLB (*Passive Lysis Buffer*, Promega) wurden zugegeben und bei RT unter leichtem Schütteln 15 min lang inkubiert.
- Bis zur Messung der Luciferase-Aktivitäten wurden die Lysate bei -80 °C gelagert.

### 3.6.3 Bestimmung der Reporter-Gen-Aktivität

Die luminometrische Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten ermöglichte uns freundlicherweise die Arbeitsgruppe Nordheim an ihrem Luminometer. Das Meßprotokoll des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* von Promega wurde nach einer persönlichen Mitteilung von Dr. F. Gaunitz wie folgt modifiziert:

- Die Einstellungen am Luminometer waren: keine Meßverzögerung, 10 sec Meßzeit.
- Zur Messung der *firefly*-Luciferase-Aktivität wurde in jedes Luminometerröhrchen 20  $\mu$ l LARII (*Luciferase Assay Reagent II*, Promega) vorgelegt. 4  $\mu$ l des zu messenden Lysats wurden zugegeben und durch Triturieren mit der Pipette untergemischt. Die Messung erfolgte sofort danach.
- Zur Messung der *Renilla*-Luciferase-Aktivität wurden 20  $\mu$ l „*Stop & Glo*“-Reagenz (Promega) zugegeben. Sofort danach wurde kurz auf Vortex gemischt und sofort im Luminometer gemessen.
- Von jeder Probe wurde die relative Reporter-Gen-Aktivität wie folgt berechnet:

$$\text{relative Reporter-Gen-Aktivität} = \frac{\text{firefly - Luciferase - Aktivität}}{\text{Renilla - Luciferase - Aktivität}}$$

#### **3.7 Apoptoseuntersuchung im Cytofluorometer**

In einem Cytofluorometer können durchflußcytometrische Messungen von Partikeln durchgeführt werden. Die analysierten Partikel können unter anderem Zellen, Zellorganellen oder Chromosomen sein. Diese werden in Suspension durch eine Düse geführt. Der austretende Flüssigkeitsstrom ist so fein, daß in dessen Querschnitt jeweils nur ein Partikel Platz findet. Die auf diese Weise im Flüssigkeitsstrom vereinzelt Partikel werden am Analysator vorbeigeführt und dort von einem Laser angestrahlt. Die durch Wechselwirkung mit dem Partikel auftretenden Streu- und Fluoreszenzeffekte werden von einer Vielzahl von Detektoren in digitale Daten umgewandelt, die ein angeschlossener Computer speichert. Mit diesen Daten ist es dem Experimentator möglich, auf eine ganze Reihe unterschiedlicher Eigenschaften jedes einzelnen Partikels zu schließen. Dabei stehen häufig neben physikalischen Eigenschaften des Partikels, die durch das Streulicht analysiert werden können, vor allem biochemische Eigenschaften biologischer Materialien im Mittelpunkt des Interesses. Diese können durch Anwendung geeigneter Fluorochrome, die an Trägermoleküle gebunden sein können, zugänglich gemacht werden. Wenn die Fluorochrome an das biologische Material binden und/oder infolge der Veränderung biochemischer Parameter ihr Fluoreszenzspektrum verändern, kann dies im Cytofluorometer nachgewiesen werden. Durch Verwendung von mehreren Fluorochromen mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften können auch mehrere biochemische Eigenschaften gleichzeitig analysiert werden (Shapiro, 1984).

Das hier verwendete Cytofluorometer FACSCalibur von Becton-Dickinson besitzt einen Argon-Laser, der monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Propidium-Iodid, ein DNA-Interkalator, besitzt ein Excitationsmaximum von 490 nm und ein Emissionsmaximum bei 630 nm. Das Fluoreszenz-Signal eines Partikels nach einer solchen Färbung war daher ein geeignetes Maß für dessen DNA-Gehalt.

Nicoletti *et al.* (1991) entwickelten eine schnelle und einfache Methode, um Apoptose spezifisch im Cytofluorometer nachzuweisen. Dabei bildeten nur apoptotische Zellen im Fluoreszenz-Histogramm ein hypodiploides Signal. Wie es Fried *et al.* bereits 1978 beschrieben hatten, wurden dazu die Zellen in einem hypotonen Puffer mit Propidium-Iodid inkubiert, so daß die Kerne aus den Zellen freigesetzt wurden und Propidium-Iodid sich in die DNA einlagern konnte. Diese Methode der Zellaufarbeitung war nach Nicoletti *et al.* (1991) einer Ethanol-Fixierung und RNase-Behandlung von Zellen in der Hinsicht überlegen, als die Signale im Fluoreszenzhistogramm einen geringeren Variationskoeffizienten aufwiesen und die Diskriminierung von diploiden und subdiploiden Kernen leichter fiel.

### **3.7.1 Aufarbeitung der Zellen**

- Aussaat und Behandlung von FTO-2B-Zellen erfolgte in 3.5 cm-Schalen wie unter 3.2 beschrieben.
- Der Zellrasen wurde mit 1.5 ml PBS gewaschen und mit 300 µl Trypsin/EDTA bei 37 °C von der Unterlage abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 1 ml der vereinigten Fraktionen aus Wasch-PBS und aus abgenommenem Medium gestoppt.
- Die Zellen wurden vereinzelt, indem die Zellsuspension drei Mal durch eine gelbe Kanüle (20GX1 $\frac{1}{2}$ “) gezogen wurde. Die Zellsuspension wurde dann auf Eis gelagert.
- Die Zellsuspension wurde zweimal gewaschen, indem sie 5 min bei 200 g und RT abzentrifugiert wurde und das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert wurde.
- 3 ml der Zellsuspension wurden 5 min bei 200 g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl hypotonem Propidiumiodidpuffer resuspendiert und nach ca. 5 min im Cytofluorometer analysiert.

### **3.7.2 Fluoreszenz-Messung**

Die Messung erfolgte an einem FACSCalibur-Cytofluorometer der Firma Becton-Dickinson unter Anwendung der Software CellQuest.

Zur Analyse der Proben wurden drei Parameter analysiert:

- FSC-H (forward scatter horizontal):  
Laserlichtstreuung in Richtung des Laserstrahles.  
Ein Maß für die Größe des analysierten Teilchens.
- SSC-H (side scatter horizontal):  
Laserlichtstreuung senkrecht zum Laserstrahl.  
Ein Maß für die Granularität der Probe, das bspw. mit der Anzahl von zellulären Einschlüssen steigt oder durch eine raue Oberfläche erhöht wird.
- FL2-H (Fluoreszenzbereich 2, horizontal):  
Fluoreszenzlicht im Bereich des Fluoreszenzspektrums von Propidiumiodid, das durch eine Kombination von halbdurchlässigen Spiegeln in den Analysator Nr. 2 des Cytofluorometers gelenkt wird.  
In dieser Anwendung ist FL2-H ein Maß für die Menge des Propidiumiodids, daß in die DNA interkaliert vorliegt. Daher stellt FL2-H ein Maß für den DNA-Gehalt des gemessenen Partikels dar.

### 3.7.3 Analyse der Fluoreszenz-Daten

Anhand der drei Meßparameter ließen sich die Signale in vier unterschiedliche Signalpopulationen unterteilen, in Klammern ist die Farbkodierung von Abb. 3-2 genannt:

#### 1. Nicht-apoptotische Zellen (grün):

Das Histogramm der FL2-Intensität dieser Partikel zeigte das Bild einer typischen Zellzyklusverteilung in einem FL2-Intervall von ungefähr  $2 \cdot 10^3$  bis ca.  $6 \cdot 10^3$ : Signalgipfel durch Zellen in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und in G<sub>2</sub>/M-Phase, dazwischen die Signale von Zellen in S-Phase (s. Abb. 3-3A und 3-4A). Die Partikel waren relativ groß. Region R1 (Abb. 3-2) wurde so definiert, daß sie alle Zellzyklussignale und damit alle nicht-apoptotischen Kerne enthielt (vgl. Abb. 3-3A mit Abb. 3-3B).

Die Zahl der nicht-apoptotischen Zellen ergab sich aus der Zahl der Signale mit einem FL2-Signal innerhalb des Intervalls der Zellzyklusverteilung, deren FSC-SSC-Wertepaar innerhalb der durch Region R1 definierten Wertemenge lag.

#### 2. Aggregate (schwarz):

Diese Signale wiesen eine FL2-Signalintensität auf, die oberhalb der Signale der Zellzyklusverteilung lag (s. Abb. 3-3A und 3-4A). Sie waren eher größer als die Partikel, die nicht-apoptotischen Zellen zugeordnet wurden (s. Abb. 3-2). Da nicht erkennbar war, aus wievielen und aus welchen Subpartikeln sie bestanden, wurden diese Signale bei der Apoptose-Analyse nicht berücksichtigt.

#### 3. Debris-Population (blau):

Diese Signale stammten von kleinen Partikeln ab (engl. *debris* = Trümmer; s. Abb. 3-2) und wiesen eine sehr geringe FL2-Intensität auf ( $FL2 < 1 \cdot 10^1$  in Abb. 3-3 bzw. 3-4). Region R2 in Abb. 3-2 wurde dabei so gewählt, daß nahezu alle Signale mit  $FL2 < 1 \cdot 10^1$  in diesem Bereich lagen und kein Signal einer nicht-apoptotischen Zelle darin zu finden war (vgl. Abb. 3-3A mit Abb. 3-3B und Abb. 3-4A mit Abb. 3-4B).

In Proben mit apoptotischen Zellen nahm die Zahl so charakterisierter Zählereignisse stark zu. Dies rührte vermutlich von kleinen, apoptotischen Kernfragmenten her, die nur noch sehr wenig DNA aufwiesen.

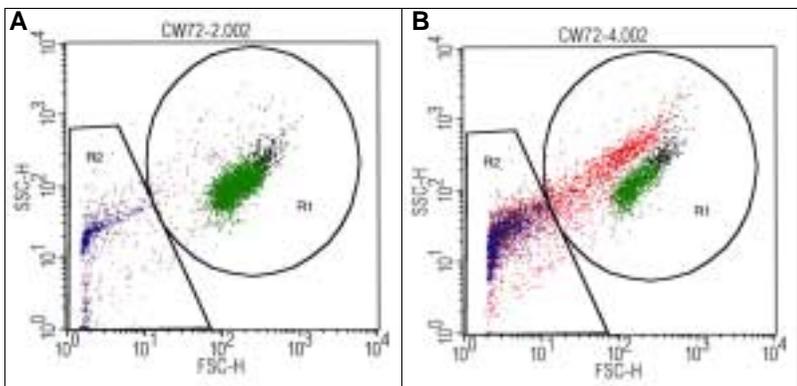
Signale der *debris*-Population wurden nicht in die Analyse einbezogen.

#### 4. Apoptotische Zellen (rot):

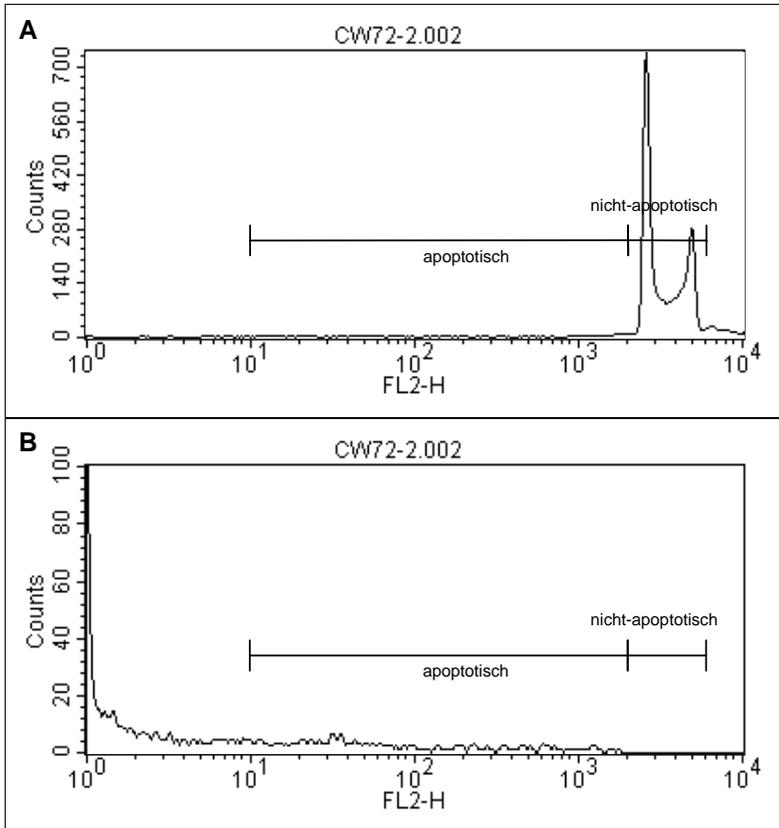
Diese Signale lagen von ihrer FL2-Intensität her zwischen nicht-apoptotischen Zellen und *debris* (Abb. 3-3 und 3-4). Dies kann den Abbau von DNA und/oder eine Fragmentierung von Kernen reflektieren, wie sie unter Apoptose beobachtet wird. Viele Partikel mit dieser FL2-Intensität waren kleiner als Kerne nicht-apoptotischer Zellen (s. Abb. 3-2B). Dies kann mit apoptotischer Kernfragmentierung erklärt werden. Außerdem wiesen diese Partikel einen höheren SSC-Wert auf als die nicht-

apoptotischen Partikel (s. Abb. 3-2B), wie es die Apoptose-typische Chromatin-Kondensation erwarten ließ. Für die Apoptose-Analyse wurden nur die recht großen Partikel berücksichtigt, deren Signal in die Region R1 fiel. Diejenigen Zählereignisse kleinerer Fragmente, deren Signal in Region R2 fiel, wurden nicht berücksichtigt, um die Mehrfachzählung des originären Zellkerns zu vermeiden.

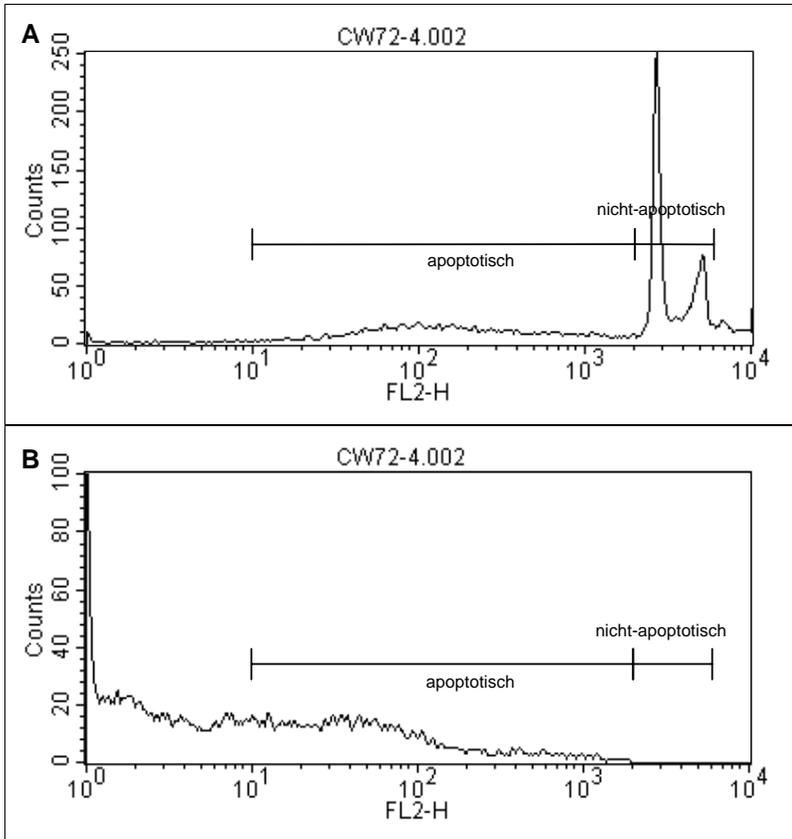
Die Detektion der Parameter erfolgte auf einer logarithmischen Skala, da auf dieser leichter zwischen nicht-apoptotischen, apoptotischen und *debris*-Signalen zu unterscheiden ist (Nicoletti *et al.*, 1991).



**Abbildung 3-2: FSC-SSC-Plots der Cytofluorometer-Messung.** Region R1 umfaßte alle Zählereignisse, die im Histogramm des DNA-Gehaltes zum Bild einer Zellzyklusverteilung beitrugen und daher als nicht-apoptotische Zellen interpretiert wurden (grün; s. Abb. 3-3A und 3-4A). Region R2 enthielt fast alle Zählereignisse, die so klein waren und deren DNA-Gehalt so gering war, daß sie als von *debris* stammend interpretiert wurden (blau; s. Abb. 3-3B und 3-4B). **A: FSC-SSC-Plot einer Probe, in der wenig Apoptose auftrat.** Vielen nicht-apoptotischen Signalen (grün) standen relativ wenig *debris* (blau) und kaum potentiell apoptotische Signale (rot) gegenüber. **B: FSC-SSC-Plot einer Probe, in der Apoptose auftrat.** Auffällig waren die größere Anzahl von potentiell apoptotischen Signalen (rot) und von *debris* (blau). Potentiell apoptotische Signale wiesen einen höheren SSC-Wert auf als nicht-apoptotische Signale (grün). Farbsymbolik: Blau: *debris*; Rot: potentiell apoptotische Signale; Grün: nicht-apoptotische Zellen; Schwarz: Aggregate. Abkürzungen: FSC-H: *forward scatter horizontal*; SSC-H: *side scatter horizontal*; R1: Region 1; R2: Region 2.



**Abbildung 3-3: Apoptose-Analyse der Fluoreszenz-Daten einer Probe, die keine Apoptose aufwies.** Dargestellt sind die Histogramme des FL2-Signals, das ein Maß für den DNA-Gehalt des gemessenen Partikels darstellt. **A: Region R1.** Dieses Diagramm enthält diejenigen Zählereignisse, die in Abb. 3-2A in Region R1 zu finden sind. Anhand dieses Histogramms wurde die Apoptose-Analyse durchgeführt. Deutlich erkennbar ist das FL2-Intervall, in dem sich eine typische Zellzyklusverteilung abzeichnet. Zählereignisse in diesem Intervall wurden als "nicht-apoptotisch" gewertet. Zählereignisse darunter bis zu einem FL2-Wert von  $1 \cdot 10^1$  wurden als "apoptotisch" gewertet. **B: Region R2.** Dieses Diagramm enthält diejenigen Zählereignisse sehr kleiner Partikel, die in Abb. 3-2A in Region R2 zu finden sind. Es zeigt, daß sich in dieser Region keine Signale befinden, die im Bereich der Zellzyklusverteilung des DNA-Gehaltes nicht-apoptotischer Zellen liegen. Abkürzungen: FL2-H: Fluoreszenzbereich 2, horizontal.



**Abbildung 3-4: Apoptose-Analyse der Fluoreszenz-Daten einer Probe, die Apoptose aufwies.** Dargestellt sind Histogramme des DNA-Gehalts (FL2-H). **A: Region R1.** Dieses Diagramm enthält diejenigen Zählereignisse, die in Abb. 3-2A in Region R1 zu finden sind. Anhand dieses Histogramms wurde die Apoptose-Analyse durchgeführt. Im Gegensatz zu einer Probe mit wenig apoptotischen Zellen (Abb. 3-3A) findet sich hier unterhalb der Zellzyklusverteilung eine große Anzahl an Signalen mit einem Maximum bei ca.  $1 \cdot 10^3$ , die als Signale von Kernen aus apoptotischen Zellen gewertet wurden. **B: Region R2.** Dieses Diagramm enthält diejenigen Zählereignisse sehr kleiner Partikel, die in Abb. 3-2B in R2 zu finden sind. Im Vergleich zur Probe mit wenig apoptotischen Zellen (Abb. 3-3B) finden sich hier weit mehr potentiell apoptotische Signale, die jedoch aufgrund der geringen Größe der Partikel lediglich sehr kleine Kernfragmente darstellen dürften. Daher wurden diese Signale nicht in die Auswertung einbezogen. Abkürzungen: FL2-H: Fluoreszenzbereich 2, horizontal.

### **3.8 Zellzyklusuntersuchung im Cytofluorometer**

Da sich im Laufe der Teilung einer Zelle deren DNA-Gehalt ändert, konnte ein solches Signal auch zur Analyse der Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation herangezogen werden. Der DNA-Gehalt von Zellen ohne Zellteilungsaktivität ( $G_0$ -Phase) und von sich teilenden Zellen direkt nach der Mitose ( $G_1$ -Phase) nimmt mit Beginn der DNA-Synthese in der S-Phase (Synthese-Phase) zu. Mit Abschluß der S-Phase enthält die Zelle in der  $G_2$ -Phase und zu Beginn der Mitose (M-Phase) im Vergleich zur  $G_0/G_1$ -Phase das doppelte an DNA.

Die Auswertung eines Fluoreszenz-Histogramms durch das Definieren von Fluoreszenz-Intervallen, innerhalb derer die Signale einer bestimmten Zellphase zugeordnet wurden, konnte nur intuitiv durchgeführt werden, da sich keine scharfen Grenzen im Histogramm abzeichneten. Aus diesem Grund wurde die Zellzyklusuntersuchung mit dem Programm ModFit durchgeführt, das in der Lage ist, eine komplexe mathematische Modellierung der Daten durchzuführen und dabei sowohl *debris* als auch Aggregate berücksichtigen kann.

#### **3.8.1 Aufarbeitung der Zellen**

##### **3.8.1.1 Aufarbeitung von FTO-2B**

Zellen der Zelllinie FTO-2B wurden wie unter 3.7.1 beschrieben aufgearbeitet.

##### **3.8.1.2 Aufarbeitung von HepG2**

Da die Zelllinie HepG2 stärker als FTO-2B zur Aggregation neigte, war im Vergleich zu FTO-2B ein anderes Vorgehen notwendig:

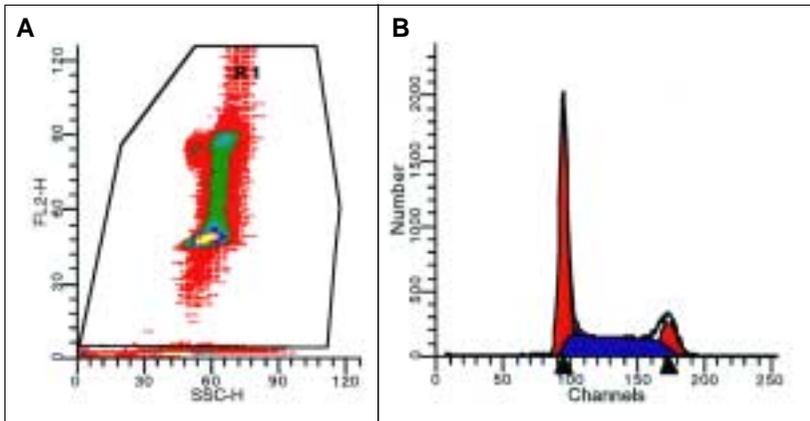
- Aussaat und Behandlung erfolgte in 3.5 cm-Schalen wie unter 3.2 beschrieben.
- Der Zellrasen wurde mit 1.5 ml PBS gewaschen und mit 300  $\mu$ l Trypsin/EDTA von der Unterlage abgelöst.
- Die Zellen wurden vereinzelt, indem die Zellsuspension zehn Mal durch eine gelbe Kanüle (20GX1 $\frac{1}{2}$ " ) gezogen wurde. Die Zellsuspension ließ man dann weitere 5 min bei RT inkubieren, bevor die Zellen ein weiteres Mal vereinzelt wurden, indem die Zellsuspension zehnmal durch eine gelbe Kanüle gezogen wurde.
- Die Zellsuspension wurde 3 min bei 200 g und RT abzentrifugiert.
- Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest (ca. 20  $\mu$ l) vorsichtig abgesaugt. In diesem Rest wurden die Zellen mit einer 200  $\mu$ l-Pipettenspitze vorsichtig resuspendiert, bevor sie in 500  $\mu$ l Propidiumiodid-Puffer resuspendiert wurden.
- Die Zellen wurden bei RT 5 min lang inkubiert und dann im Cytofluorometer analysiert.

#### **3.8.2 Fluoreszenz-Messung**

Die Messung erfolgte wie unter Kap. 3.7 beschrieben, jedoch verlangte die Auswertungssoftware ModFit die FL2-H-Detektion auf einer linearen Skala.

### 3.8.3 Analyse der Fluoreszenz-Daten

Die Propidiumiodid-Fluoreszenz wurde im Fluoreszenz-Bereich 2 (FL2-H) ausgewertet. Das Fluoreszenz-Signal der Zählereignisse zeigte unter CellQuest auf der linearen Skala etwa zwischen 320 und 760 die typische zweipflige Verteilung einer Zellpopulation sich teilender Zellen. Ober- und unterhalb dieses Bereiches finden sich weitere Fluoreszenz-Signale, die von *debris* und von Aggregaten stammen könnten. Das Hauptsignal des *debris* am unteren Ende des FL2-Signalspektrums wurde dabei von der Analyse ausgeschlossen, wie Abbildung 3-5A exemplarisch zeigt.



**Abbildung 3-5: Analyse der Zellzyklusverteilung aufgrund von Cytofluorometerdaten. A: Auswahl der ausgewerteten FL2-Signale.** Mit Ausnahme der Signale mit sehr kleinen FL2-Werten wurden alle in die Analyse einbezogen. **B: Auswertungsergebnis von ModFit.** Die Konturlinie stellt das Histogramm der FL2-Daten dar. Farbige Flächen stellen die Modellierung der Daten dar. Rote Flächen bei Channel  $\approx 100$  bzw.  $\approx 175$  stellen dabei die Modellierung der  $G_0/G_1$ -Phase bzw. der  $G_2/M$ -Phase dar, die blaue Fläche dazwischen die der S-Phase. Pfeile entlang der x-Achse markieren die Lage der Maxima der  $G_0/G_1$ -Phase bzw. der  $G_2/M$ -Phase. Abkürzungen: FL2-H: Fluoreszenzbereich 2, horizontal; SSC-H: *side scatter horizontal*.

Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurden ModFit folgende Angaben gemacht:

Lage des $G_0/G_1$ -Signals:	automatische Detektion
Lage des $G_2/M$ -Signals:	manuelle Bestimmung
Modellierungsmodus der S-Phase-Signale:	1 Kompartiment, trapezoide Gestalt
<i>Debris</i> -Modellierung:	ja
Aggregate-Modellierung:	ja

Ein typisches Ergebnis einer Zellzyklus-Analyse unter ModFit in graphischer Form zeigt Abbildung 3-5B. Darüber hinaus liefert dieses Programm auch die Anzahl der Zählereignisse, die das Programm den drei Zellzyklusphasen, dem *debris* und den Aggregaten zuordnet.

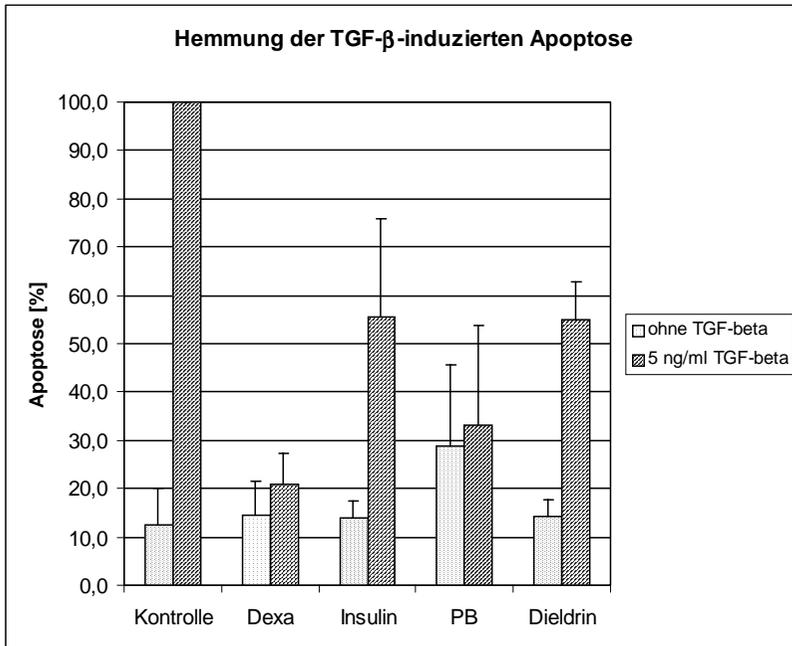
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Die antiapoptotische Aktivität von Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin**

Das TGF- $\beta$ -System wird in mehreren Organsystemen als Tumorsuppressor angesehen, so auch in der Leber (Markowitz *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1998a). Apoptoseinduktion in Hepatocyten stellt einen möglichen Weg der TGF- $\beta$ -vermittelten Tumorsuppression dar (Lin und Chou, 1992; Oberhammer *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1993; Chuang *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996; Buchmann *et al.*, 1999). Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob Tumorpromotoren der Leber diese tumorsuppressive TGF- $\beta$ -Aktivität hemmen.

Das Antiepileptikum Phenobarbital wirkt in der Nagerleber tumorpromovierend (Peraino *et al.*, 1971), was auf eine Hemmung der Apoptose zurückgeführt werden könnte (Bursch *et al.*, 1984; Schulte-Hermann *et al.*, 1990). Dieldrin besitzt tumorpromovierende Aktivität in der Maus, jedoch möglicherweise nicht in der Ratte (Fitzhugh *et al.*, 1964; Ito *et al.*, 1983). Daß beide Substanzen in FTO-2B-Rattenhepatomzellen Apoptose hemmen, konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Buchmann *et al.*, 1999). Durch diese Arbeit wurden auch Untersuchungen bestätigt, die zeigten, daß sowohl Insulin als auch Dexamethason in Hepatomzellen eine antiapoptotische Aktivität entfalten (Chuang *et al.*, 1994; Tanaka und Wands, 1996; Chen *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde Apoptose durch Messung des DNA-Gehalts in Zellkernen bestimmt (Nicoletti *et al.*, 1991). Dabei werden Zellen in einem hypotonen, Detergenzien-haltigen Puffer aufgeschlossen, wodurch die DNA in den intakten Kernen für die Färbung mit Propidiumiodid, einem DNA-interkalierenden Fluorogen, zugänglich gemacht wird. Die Menge des mit der DNA eines Zellkerns interagierenden Propidiumiodids kann anschließend in einem Cytofluorometer analysiert werden (s. Kap. 3.7). Dabei zeichnen sich Kerne aus apoptotischen Zellen durch einen DNA-Gehalt aus, der geringer ist als der von Kernen einer vitalen Zelle, die sich in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase befindet (weitere Einzelheiten zur Analyse der Cytofluorometer-Daten: s. Kap. 3.7.1 und 3.7.2).



**Abbildung 4-1: Ergebnis der Apoptoseuntersuchung.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 5<sup>ng/ml</sup> TGF-β und zusätzlich 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin, 2 mM Phenobarbital oder 25 μM Dieldrin 24 h lang behandelt. Aus den Zellen wurden Kerne gewonnen und die DNA darin mit Propidiumiodid gefärbt. Die Propidiumiodidfärbung wurde per Cytofluorometrie quantifiziert. Ausgewertet wurden etwa Kern-große Partikel. Als Kerne apoptotischer Zellen wurden solche mit einem subdiploiden DNA-Gehalt gewertet. Zur Kontrolle wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt, mit den Substanzen Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin je drei. In jedem Versuch wurde der Anteil subdiploider Zellen der TGF-β-Kontrolle zu 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen sowie die statistische Signifikanz einer Abweichung von den nur mit TGF-β-behandelten Zellen laut Students t-Test. Abkürzungen und Symbole: Dexa: Dexamethason; PB: Phenobarbital; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

Abbildung 4-1 faßt die Ergebnisse der Apoptoseuntersuchung zusammen (Kap. 6.2.1, Tab. 1). Alle vier verwendeten Substanzen hemmten TGF-β-induzierte Apoptose, wobei Insulin und Dieldrin schwächer wirksam waren als Phenobarbital und Dexamethason.

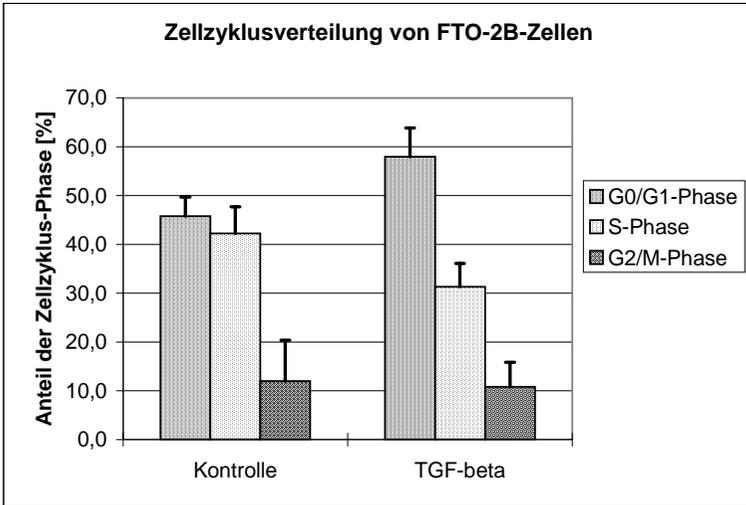
#### **4.2 Der antimitogene Effekt von TGF- $\beta$ und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren**

Einer der beobachteten biologischen Effekte von TGF- $\beta$  ist die Hemmung des Zellzyklus von Rattenhepatocyten am G<sub>1</sub>/S-Übergang (Sporn *et al.*, 1986; Carr *et al.*, 1986; Wollenberg *et al.*, 1987; Russell *et al.*, 1988; Roberts und Sporn, 1990; Massagué *et al.*, 1990; Thoresen *et al.*, 1992). Da diese Wirkung bei normalen Rattenepithelzellen stärker ausfällt als in malignen (McMahon *et al.*, 1986; Sporn *et al.*, 1986), könnte der Verlust dieser antimitogenen TGF- $\beta$ -Antwort einen Teilprozeß der Karzinogenese dieser Zellen darstellen.

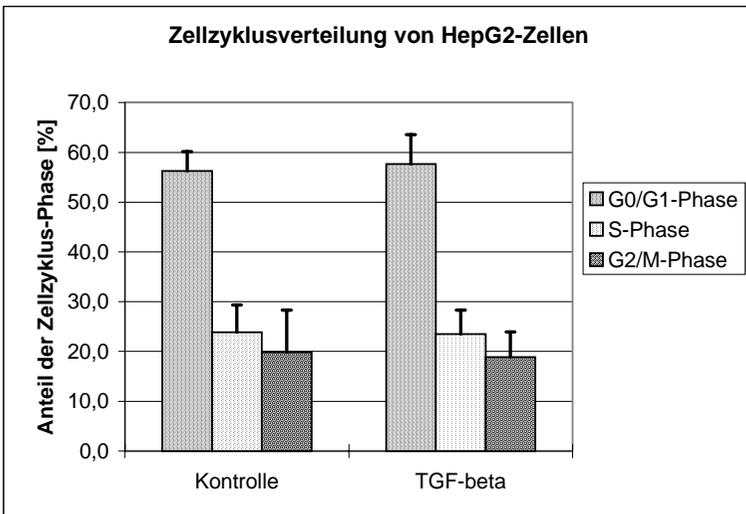
Zur Messung des TGF- $\beta$ -Effekts auf den Zellzyklus wurde von Zellen der Rattenhepatomlinie FTO-2B und der humanen Hepatoblastomlinie HepG2 der DNA-Gehalt der Zellkerne gemessen. Diese wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Willy in der Arbeitsgruppe durch Aufschluß der Zellen, Färbung der DNA in den Kernen mit Propidiumiodid und Quantifizierung des Signals im Cytofluorometer durchgeführt. Da sich die DNA-Gehalte einer Zelle in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>/M-Phase unterscheiden, kann aus dem Histogramm des Fluoreszenz-Signals des Propidiumiodids mittels eines geeigneten Algorithmus, wie ihn das Programm ModFit (Becton-Dickinson) bereithält, die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation berechnet werden (s. Kap. 3.8).

HepG2-Zellen wiesen nach TGF- $\beta$ -Behandlung keinen erkennbaren Unterschied der Zellzyklusverteilung gegenüber der Kontrolle auf (Abb. 4-2B; s. Kap. 6.2.2, Tabelle 6). Dagegen zeigten FTO-2B-Zellen (Abb. 4-2A; s. Kap. 6.2.2, Tabellen 3 und 4) eine Zunahme an Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase um mehr als 10 % ( $p < 0.01$ ) und eine Abnahme der Zellen in der S-Phase um mehr als 10 % ( $p < 0.01$ ), während der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase unverändert blieb. Während also HepG2-Zellen kein Anzeichen einer antimitogenen TGF- $\beta$ -Antwort zeigten, war dies bei FTO-2B-Zellen der Fall.

A



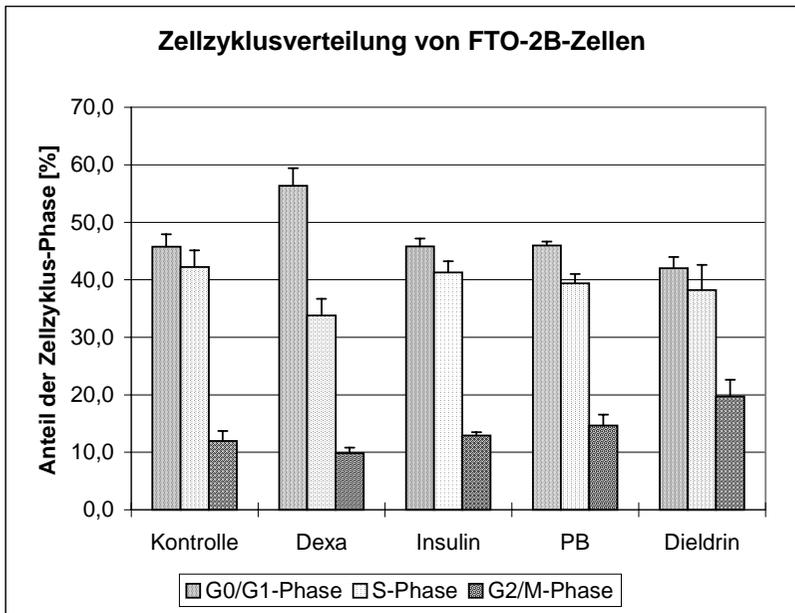
B



**Abbildung 4-2: Einfluß von TGF- $\beta$  auf die Zellzyklusverteilung.** FTO-2B-Zellen bzw. HepG2-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 5 <sup>ng/ml</sup> TGF- $\beta$  24 h lang behandelt. Aus den Zellen wurden Kerne gewonnen und die DNA darin mit Propidiumiodid gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde per Cytofluorometrie quantifiziert. Die Zellzyklusverteilung wurde mit ModFit analysiert. Je fünf unabhängige Versuche wurden durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Statistische Signifikanz der Abweichung gegenüber den Kontrollzellen wurde mittels beidseitigem Students t-Test überprüft. Symbole: \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

## 4.2 Der antimitogene Effekt von TGF- $\beta$ und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren

Um zu testen, ob die antimitogene TGF- $\beta$ -Wirkung mit dessen proapoptotischem Effekt in engem Zusammenhang steht, wurden zwei weitere Analysen durchgeführt. Es wurde erstens untersucht, ob Substanzen, die TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose hemmen, selbst einen Einfluß auf die Zellzyklusverteilung besitzen. In einem zweiten Versuch wurde die mögliche Hemmung des antimitogenen TGF- $\beta$ -Effektes durch diese Substanzen untersucht. Mit diesen Daten sollte außerdem geprüft werden, ob ein Zellzyklus-spezifischer Eintrittspunkt in die Apoptose existieren könnte, der über eine Verschiebung des Zellzyklus durch Apoptoseinhibitoren vermieden wird.

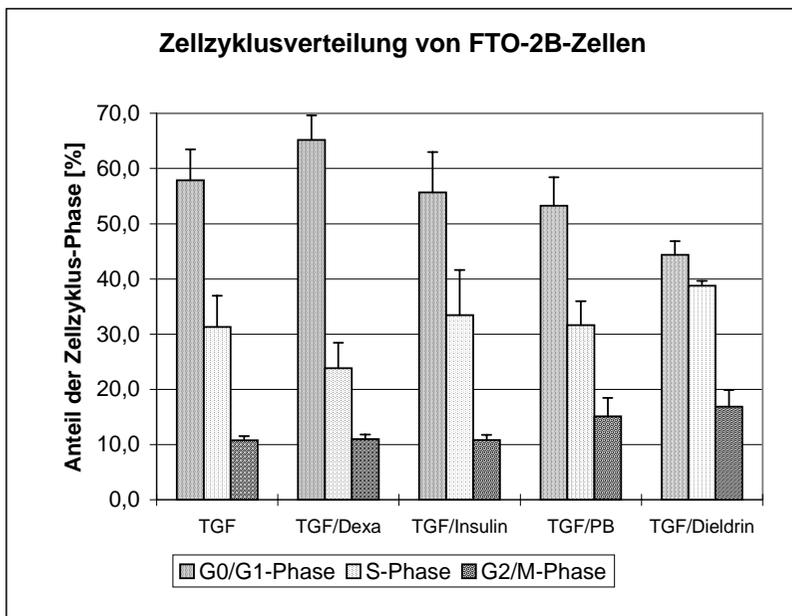


**Abbildung 4-3: Effekte antiapoptotischer Substanzen auf die Zellzyklusverteilung.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat 24 h lang mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin, 2 mM Phenobarbital oder 25  $\mu$ M Dieldrin behandelt. Aus den Zellen wurden Kerne gewonnen und die DNA darin mit Propidiumiodid gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde per Cytofluorometrie quantifiziert. Die Zellzyklusverteilung wurde mit ModFit analysiert. Je fünf bzw. drei unabhängige Versuche wurden für die Kontrolle bzw. die vier antiapoptotischen Substanzen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen sowie die statistische Signifikanz einer Abweichung von der Kontrolle laut Students t-Test. Abkürzungen und Symbole: Dexa: Dexamethason; PB: Phenobarbital; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Die Abbildungen 4-3 und 4-4 zeigen, daß Apoptoseinhibitoren weder für sich alleine noch in Kombination mit TGF- $\beta$  einen sehr deutlichen, einheitlichen Einfluß auf den Zellzyklus ausübten.

Die Wirkung antiapoptotischer Substanzen auf die Zellzyklusverteilung war der des TGF- $\beta$  nicht entgegengesetzt (Abb. 4-3). Im Gegenteil: Dexamethason, der wirksamste untersuchte Apoptoseinhibitor, verursachte stattdessen eine gleichgerichtete Veränderung des Zellzyklus. Nach einer 24-stündigen Behandlung befanden sich über 10 % mehr Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus ( $p < 0.05$ ), knapp 10 % weniger in der S-Phase ( $p < 0.05$ ) und tendenziell etwas weniger Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase ( $p \approx 0.067$ ). Die Dieldrinbehandlung bewirkte eine Zunahme der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase um knapp 10 % ( $p < 0.05$ ). Insulin und Phenobarbital übten keinen erkennbaren Einfluß auf die Zellzyklusverteilung aus (s. Kap. 6.2.2, Tabellen 3 und 4).

Die vier Apoptosesuppressoren wiesen auch bei einer Kombinationsbehandlung mit TGF- $\beta$  unterschiedliche Einflüsse auf den Zellzyklus auf (Abb. 4-4 und Kap. 6.2.2, Tabellen 3 und 5). Insulin und Phenobarbital wiesen keinen signifikanten Einfluß auf die Veränderung der Zellzyklusverteilung durch TGF- $\beta$  auf. Dexamethason zeigte in der Tendenz eine Verstärkung der TGF- $\beta$ -induzierten Zellzyklusverschiebung in Form einer Zunahme bzw. Abnahme des Anteils der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- bzw. der S-Phase um jeweils etwa 7 % ( $p$  jeweils kleiner 0.1). Dieldrin verursachte auch in diesem Versuchsteil tendenziell eine Zunahme von Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase (plus 9 %,  $p \approx 0.07$ ). Außerdem wirkte Dieldrin einer TGF- $\beta$ -induzierten Veränderung der Zellzyklusverteilung entgegen: Gegenüber den TGF- $\beta$ -behandelten Zellen zeigten zusätzlich mit Dieldrin behandelte Zellen eine Abnahme des Anteils der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase um mehr als 10 % ( $p < 0.01$ ) und eine Zunahme von Zellen in der S-Phase um knapp 8 % ( $p < 0.05$ ). Damit war in Dieldrin-behandelten Zellen die TGF- $\beta$ -induzierte Veränderung der Zellzyklusverteilung nahezu vollständig gehemmt (vgl. Abb. 4-3 und Abb. 4-4 und siehe auch Kap. 6.2.2, Tabelle 3).



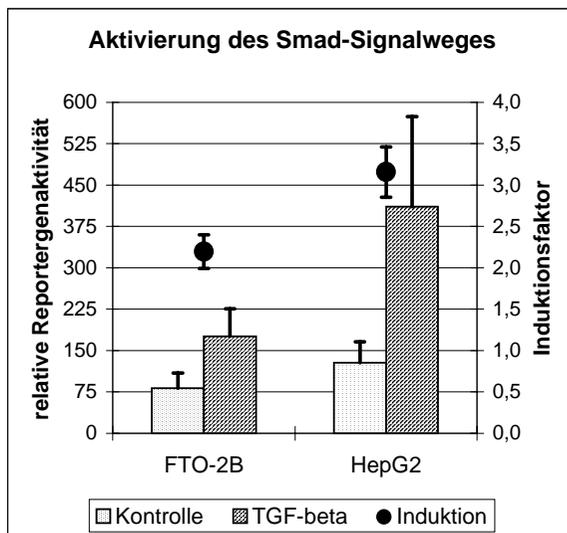
**Abbildung 4-4: Einfluß antiapoptotischer Substanzen auf den Zellzyklus unter TGF- $\beta$ -Behandlung.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat 24 h lang mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin, 2 mM Phenobarbital oder 25  $\mu$ M Dieldrin sowie mit 5 ng/ml TGF- $\beta$  behandelt. Aus den Zellen wurden Kerne gewonnen und die DNA darin mit Propidiumiodid gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde per Cytofluorometrie quantifiziert. Die Zellzyklusverteilung wurde mit ModFit analysiert. Je fünf bzw. drei unabhängige Versuche wurden für die TGF- $\beta$ -Behandlung bzw. die Kombinationsbehandlung mit den vier antiapoptotischen Substanzen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Statistische Signifikanz der Abweichung gegenüber den nur TGF- $\beta$ -behandelten Zellen wurde mittels beidseitigem Students t-Test überprüft. Abkürzungen und Symbole: Dexa: Dexamethason; PB: Phenobarbital; TGF: TGF- $\beta$ ; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### **4.3 Der Einfluß von Apoptoseinhibitoren auf den Smad-Signalweg**

In den letzten Jahren waren große Fortschritte im Verständnis der Signaltransduktion von TGF- $\beta$  zu verzeichnen. Insbesondere die Entdeckung der Smad-Proteine, die an der Weiterleitung des TGF- $\beta$ -Signals beteiligt sind und die für die genregulatorische TGF- $\beta$ -Antwort verantwortlich zu sein scheinen, war von großer Bedeutung (Zhang und Dernyck, 1999). Dieser Signalweg wird vom TGF- $\beta$ -Rezeptor vom Typ II (T $\beta$ RII) aktiviert, der bei Colonkrebs und in anderen Karzinomen mutiert vorgefunden wird (Garrigue-Antar *et al.*, 1995; Markowitz *et al.*, 1995). Smad4/DPC4 (*deleted in pancreatic cancer*), das Smad-Protein, das für die Funktion von Rezeptor-aktivierten Smad-Proteinen unabdingbar ist, wird als Tumorsuppressor des Pankreas angesehen (Hahn *et al.*, 1996). Darüber hinaus scheint der Smad-Signalweg allein bereits die antimitogene und proapoptotische Zellantwort auf TGF- $\beta$  zu vermitteln (Atfi *et al.*, 1997), die auch in der vorliegenden Arbeit in FTO-2B-Zellen beobachtet wurden (s. Kap. 4.1 und Kap. 4.2).

Eine Möglichkeit, wie die TGF- $\beta$ -vermittelten Wirkungen durch die untersuchten Verbindungen beeinflusst werden könnten, wäre demnach eine Veränderung der Signaltransduktion via Smad-Proteine. Während Untersuchungen zur Smad-Aktivierung an FTO-2B-Zellen noch nicht durchgeführt wurden, war bekannt, daß HepG2-Zellen auf TGF- $\beta$  mit einer Aktivierung des Smad-Signalweges reagieren (Jonk *et al.*, 1998), wobei diese weder Apoptose durchführen noch einen Zellzyklusarrest zeigen (s. Kap. 4.2).

Um die Aktivierung des Smad-Signalweges zu untersuchen, wurden Zellen, die mit einem TGF- $\beta$ -Reportergenkonstrukt transient transfiziert worden waren, einer Doppelbehandlung mit TGF- $\beta$ /Apoptoseinhibitor unterzogen und die Reportergenaktivität bestimmt. Dabei waren jüngere Erkenntnisse über Smad-bindende DNA-Elemente hilfreich: Waren zunächst nur TGF- $\beta$ -responsive Promotor-Elemente verschiedener Gene (JunB, PAI-1, Cyclin A) bekannt, die auch andere responsive DNA-Elemente enthielten, wurde schließlich auch das Smad-bindende DNA-Element aufgeklärt (Yingling *et al.*, 1997; Dennler *et al.*, 1998; Jonk *et al.*, 1998; Zavel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Eine solche Smad-bindende DNA-Sequenz wurde von Jonk *et al.* (1998) in mehrfacher Kopie in den Promotorbereich des *firefly*-Luciferasegens eines Plasmids inkloniert, das in dieser Arbeit als Reportergenkonstrukt diente. Wie bereits von Jonk *et al.* (1998) gezeigt, steigt die Expression des *firefly*-Luciferasegens unter TGF- $\beta$ -Inkubation an und kann als Maß für die Stärke der Smad-vermittelten, transkriptionellen TGF- $\beta$ -Antwort dienen (s. Kap. 3.6).

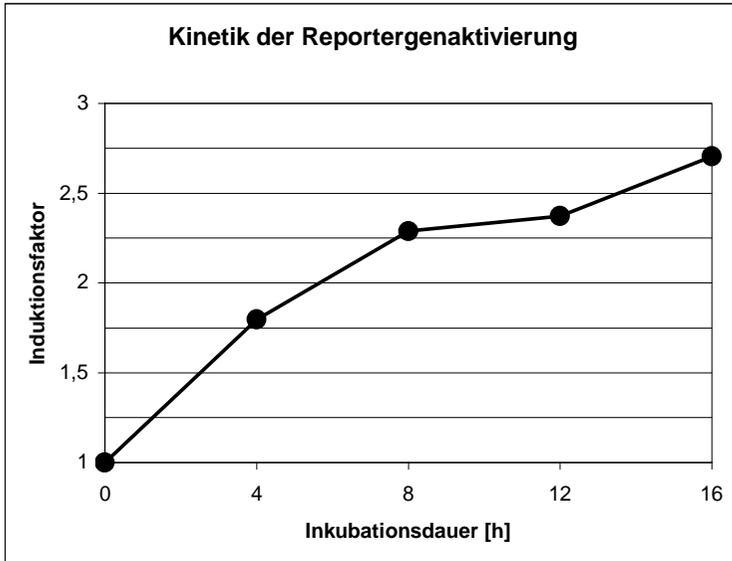


**Abbildung 4-5: Aktivierung des Smad-Signalweges durch TGF- $\beta$ .** Zellen wurden 24 h (FTO-2B) bzw. 48 h (HepG2) nach der Aussaat 16 h lang mit dem Reporterplasmid pGL3ti-(SBE)<sub>4</sub> und dem Kontrollvektor pRL-CMV transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ng/ml TGF- $\beta$  8 h (FTO-2B) bzw. 24 h (HepG2) lang behandelt. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Fünf (FTO-2B) bzw. drei (HepG2) unabhängige Versuche wurden durchgeführt, bei denen der Median der relativen Reporterogenaktivitäten von jeweils sechs Einzelexperimenten bestimmt wurde. Die Induktion ergab sich aus der Relation des Medians der relativen Reporterogenaktivität der TGF- $\beta$ -behandelten Proben zu dem der unbehandelten Proben des gleichen Versuches. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Symbole: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Die in Abbildung 4-5 gezeigten Daten (Kap. 6.2.3, Tab. 7) veranschaulichen, daß die Zellen der beiden Zelllinien FTO-2B bzw. HepG2 eine Aktivierung des Smad-Signalweges infolge einer TGF- $\beta$ -Behandlung aufwiesen, wobei die Induktion in HepG2-Zellen stärker als in FTO-2B-Zellen ausfiel (Induktionsfaktor: FTO-2B: 2.2 ( $p < 0.001$ ); HepG2: 3.2 ( $p < 0.01$ )).

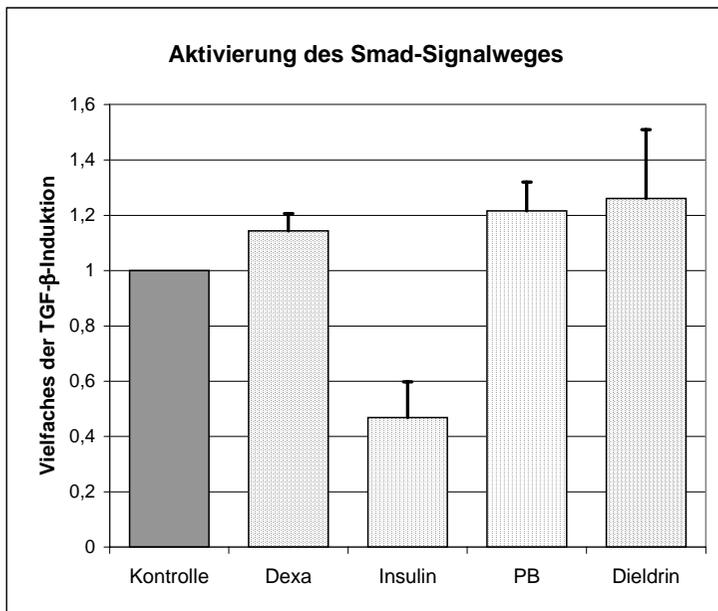
In einer weiteren Untersuchung interessierte die Kinetik des TGF- $\beta$ -Reportergetests in FTO-2B-Zellen. Dazu wurden die Zellen wie zuvor behandelt, die Aufarbeitung der Zellen erfolgte jedoch 4 h, 8 h, 12 h und 16 h nach Beginn der TGF- $\beta$ -Behandlung.

Die in Abbildung 4-6 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß bereits nach etwa 8 h TGF- $\beta$ -Inkubation die Induktion des Reportergens größtenteils abgeschlossen war: Zu diesem Zeitpunkt betrug die Induktion das etwa 2.3-fache, nachdem sie nach 4 h bereits das 1.8-fache erreicht hatte. Mit längerer Inkubationsdauer (12 h bzw. 16 h) nahm die Induktion nur noch unwesentlich zu (2.4- bzw. 2.7-fache relative Reporterogenaktivität).



**Abbildung 4-6: Kinetik der Induktion des TGF- $\beta$ -Reportergens in FTO-2B-Zellen.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat 16 h lang mit dem Reportergenplasmid pGL3ti-(SBE)<sub>4</sub> und dem Kontrollvektor pRL-CMV transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ng/ml TGF- $\beta$  bzw. mit dessen Lösungsmittel behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert, und die Luciferaseaktivitäten wurden bestimmt. Von jedem Versuch wurde der Median der relativen Reporteragenaktivitäten von jeweils vier Einzelexperimenten bestimmt. Die TGF- $\beta$ -Induktion ergab sich als das Vielfache der relativen Reporteragenaktivität der unbehandelten Kontrollprobe.

Abbildung 4-7 zeigt die Ergebnisse zur Interferenz antiapoptotisch wirksamer Substanzen mit der TGF- $\beta$ -induzierten Aktivierung des Smad-Signalweges. Lediglich Insulin war in FTO-2B-Zellen in der Lage, die TGF- $\beta$ -induzierte Aktivierung des Smad-Signalweges um etwa die Hälfte zu reduzieren ( $p < 0.05$ ; s. Kap. 6.2.3, Tab. 8). Im Gegensatz dazu nahm die Promotoraktivität des pGL3ti-(SBE)<sub>4</sub>-Plasmids unter Einfluß von Dexamethason bzw. Phenobarbital in der Tendenz zu, wenn auch nur gering ( $p = 0.065$  bzw.  $p = 0.053$ ). Die im Mittel leichte Zunahme des Reporter-Signals unter Dieldrin unterlag relativ großen Schwankungen (1.26-fach  $\pm 0.25$ ) und war statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 4-7: Interferenz antiapoptotischer Substanzen mit der Aktivierung des Smad-Signalweges durch TGF- $\beta$  in FTO-2B-Zellen.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat 16 h lang mit dem Reportergenplasmid pGL3ti-(SBE)<sub>4</sub> und dem Kontrollvektor pRL-CMV transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 8 h lang mit 5 <sup>ng/ml</sup> TGF- $\beta$  allein (Kontrolle) oder zusätzlich mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin, 2 mM Phenobarbital bzw. 25  $\mu$ M Dieldrin behandelt. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Zur Interferenzwirkung jeder Substanz wurden je drei unabhängige Versuche durchgeführt, in denen sich das Versuchsergebnis aus dem Median der relativen Reportergenaktivitäten von sechs Einzelexperimenten ergab. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Abkürzungen und Symbole: Dexa: Dexamethason; PB: Phenobarbital; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

#### **4.4 Aktivierung des ERK-Signalweges durch Apoptoseinhibitoren**

Dem ERK-Signalweg wird überwiegend eine antiapoptotische Wirkung zugesprochen (Xia *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1995a; Kinoshita *et al.*, 1995b; Leverrier *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1997). Somit ist dessen Aktivierung eine Möglichkeit, wie Apoptoseinhibitoren ihre Wirkung entfalten könnten.

Die Phosphorylierung von ERK1/2 (die Proteinkinasen, die den Abschluß der ERK-Proteinkinasekaskade bilden) an spezifischen, alkoholischen Aminoacylresten durch MKK1/2 führt zu deren Aktivierung. Im Falle der ERK1 sind dies T202 und Y204, die durch MKK1 phosphoryliert werden (Sturgill *et al.*, 1988; Payne *et al.*, 1991).

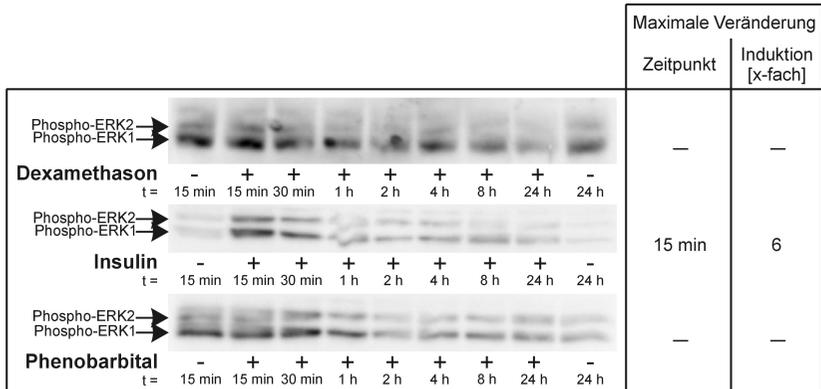
Dieses Wissen wird genutzt, um die ERK1/2-Aktivierung zu messen: Je mehr ERK1/2-Proteine aktivierend phosphoryliert sind, desto größer ist die ERK1/2-Aktivität in einer Probe. Die Aktivierung des ERK-Signalweges kann daher im Western-Blot nachgewiesen werden, bei dem ein Primärantikörper verwendet wird, der spezifisch die aktivierend phosphorylierten ERK1/2-Proteine erkennt, nicht jedoch die unphosphorylierten.

Der hier verwendete Antikörper (New England Biolabs) ist doppelt Phospho-spezifisch für Phospho-T202- und Phospho-Y204-ERK1/2 und erkennt die unmodifizierten Proteine nicht. Er erfüllt damit die genannten Voraussetzungen für eine ERK1/2-Aktivitätsmessung per Western-Blot. Dabei ist eine spezifische Doppelbande zu erwarten, deren Lage dem Molekulargewicht von ERK1 bzw. ERK2 von 42 kDa (p42) bzw. 44 kDa (p44) entspricht. Daß diese Banden diejenigen waren, die Phospho-ERK1 bzw. -ERK2 anzeigten, wurde auf zwei Wegen sichergestellt: Zum einen über den Vergleich der Bandenlage mit denen von kommerziellen Positiv- und Negativkontrollen (New England Biolabs) und zum anderen durch die Tatsache, daß diese Banden in eigenen Versuchen die einzigen waren, die sich durch Insulin-Behandlung induzieren ließen (nicht gezeigt).

Abbildung 4-8 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Insulin bewirkte bereits nach 15 min eine starke Induktion der aktivierenden Phosphorylierung sowohl von ERK1 als auch von ERK2: Die Induktion gegenüber den Lösungsmittel-behandelten FTO-2B-Hepatomzellen zu den Behandlungszeiten 15 min und 24 h betrug etwa das 6-fache. Bereits nach 30 min Behandlungszeit fand man ein wieder abnehmendes, spezifisches Signal in beiden Banden. Diese Abnahme setzte sich mit der weiteren Behandlung fort. Da bereits zum ersten untersuchten Zeitpunkt das höchste Phosphorylierungssignal gemessen wurde, ist es möglich, daß das reale Maximum der Phosphorylierung noch vor diesem Zeitpunkt lag und 15 min nach Behandlungsbeginn bereits abgenommen hatte. Zusammenfassend gesagt hatte Insulin einen aktivierenden Einfluß auf den ERK-Signalweg.

Ein solches Bild einer Signalinduktion zeigte sich nicht bei Dexamethason- oder Phenobarbital behandelten Zellen: Alle Phospho-ERK1- bzw. Phospho-ERK2-Signale zeigten die mehr oder weniger gleiche Intensität. Folglich hatten Dexamethason und Phenobarbital keinen Einfluß auf den ERK-Signalweg.

Schließlich fiel auf, daß das Signal der Phospho-ERK1 in allen Proben etwas stärker zu sein scheint als das der Phospho-ERK2.



**Abbildung 4-8: Western-Blot: Phosphorylierung von ERK1 und ERK2.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat die angegebene Zeit (15 min bis 24 h) mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin oder 2 mM Phenobarbital inkubiert. Je Spur wurden 40 µg Protein des Gesamtzellhomogenats aufgetragen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit CDP-Star durchgeführt und mit einer CCD-Kamera detektiert, bis das Signal im Bereich der spezifischen Bande der Sättigung nahe war. Gezeigt sind hier repräsentative Ergebnisse mehrerer durchgeführter Western-Blots. Die Bandenlage zeigte ein Molekulargewicht von ca. 42 bzw. 44 kDa an. Abkürzungen und Symbole: t: Inkubationszeit; +: Behandlung mit der angegebenen Substanz; -: Behandlung mit korrespondierendem Lösungsmittel.

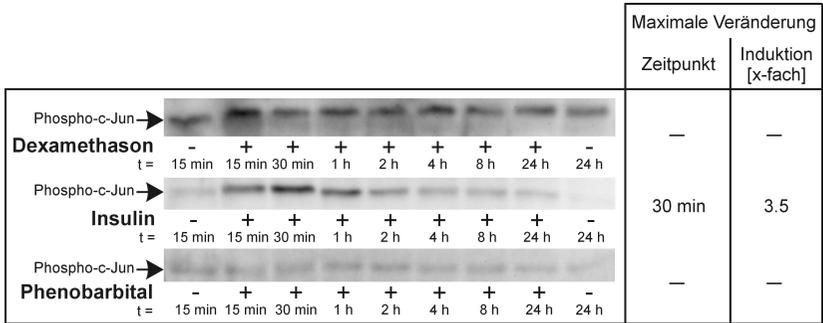
#### **4.5 Aktivierung des JNK-Signalweges durch Apoptoseinhibitoren**

Dem JNK-Signalweg wird nur unter ganz bestimmten Umständen eine antiapoptotische Wirkung zugesprochen. Zumeist wird er mit der Streßantwort von Zellen oder mit der Signaltransduktion von apoptotischen Signalen in Zusammenhang gebracht. Aufgrund der vielfachen Quervernetzung verschiedenster Signalwege und den MAPK-Kaskaden kann dieser Signalweg auch von antiapoptotischen Stimuli aktiviert werden (Whitmarsh und Davis, 1996; Ip und Davis, 1998; Dhanasekaran und Reddy, 1998).

Eines der Substrate der JNK, der MAPK des JNK-Signalweges, ist das Protein c-Jun, das durch JNK an spezifischen Serinylresten (S63 und S73) phosphoryliert (Adler *et al.*, 1992; Hibi *et al.*, 1993; Derjard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994) und damit als Transkriptionsfaktor aktiviert wird (Binetruy *et al.*, 1991; Smeal *et al.*, 1991). Der Nachweis der JNK-spezifischen Phosphorylierung im Western-Blot kann daher für die Bestimmung der Aktivierung des JNK-Signalweges herangezogen werden. Diese Voraussetzungen werden von dem hier eingesetzten Primärantikörper (New England Biolabs) erfüllt: Er erkennt c-Jun nur dann, wenn das Protein an S63 phosphoryliert vorliegt. Im Western-Blot führt dies zu einer spezifischen Bande, deren Lage dem Molekulargewicht von ca. 50 kDa entspricht. Daß diese Bande diejenige war, die Phospho-c-Jun anzeigte, wurde auf zwei Wegen sichergestellt: Zum einen über den Vergleich der Bandenlage mit denen von kommerziellen Positiv- und Negativkontrollen (New England Biolabs) und zum anderen durch die Tatsache, daß diese Bande in eigenen Versuchen die einzige war, die sich durch Insulin-Behandlung induzieren ließ (nicht gezeigt).

Abbildung 4-9 zeigt das Ergebnis der Untersuchung der c-Jun-Phosphorylierung als Maß der Aktivierung des JNK-Signalweges. Unter Insulin-Behandlung nahm die c-Jun-Phosphorylierung bereits nach 15 min Behandlung zu und erreichte mit dem etwa 3.5-fachen des Signals der Kontrollprobe sein Maximum nach 30 min. Anschließend nahm die Phosphorylierung des S63-Restes wieder ab, lag jedoch auch nach 24 h noch über der der unbehandelten Kontrollprobe. Insgesamt zeigte Insulin damit eine aktivierende Wirkung auf den JNK-Signalweg.

Dexamethason und Phenobarbital zeigten keinen erkennbaren Effekt auf die S63-Phosphorylierung des c-Jun Proteins: In allen Spuren fanden sich etwa gleich starke Antikörperbindungen. Weder Dexamethason noch Phenobarbital hatten demnach einen Einfluß auf den JNK-Signalweg.



**Abbildung 4-9: Western-Blot: S63-Phosphorylierung von c-Jun als Maß für die Aktivität der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK).** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat die angegebene Zeit (15 min bis 24 h) mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin oder 2 mM Phenobarbital inkubiert. Je Behandlung wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Je Spur wurden 20 µg Protein des Gesamtzellhomogenats aufgetragen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit CDP-Star durchgeführt und mit einer CCD-Kamera detektiert, bis das Signal im Bereich der spezifischen Bande der Sättigung nahe war. Gezeigt sind hier repräsentative Ergebnisse mehrerer durchgeführter Western-Blots. Die Bandenlage zeigte ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa an. Abkürzungen und Symbole: t: Inkubationszeit; +: Behandlung mit der angegebenen Substanz; -: Behandlung mit korrespondierendem Lösungsmittel.

### **4.6 Aktivierung der Proteinkinase B (Akt/PKB) durch Apoptoseinhibitoren**

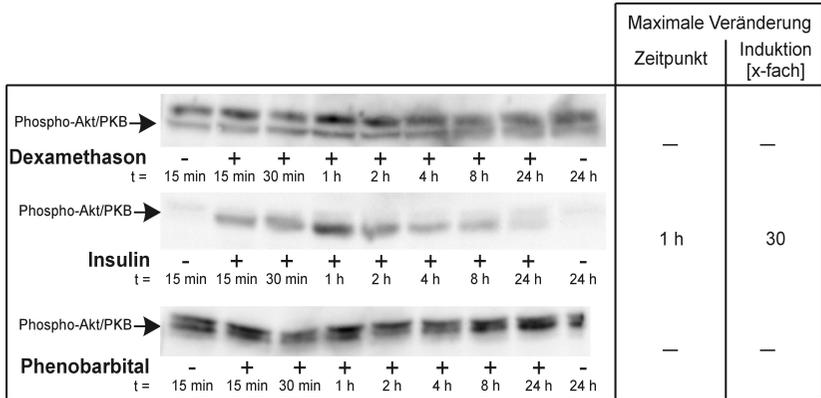
Die antiapoptotische Wirkung von Akt/PKB ist in einer Vielzahl von Fällen gezeigt worden. Es wurde eine Reihe von Mechanismen aufgeklärt, über die Akt/PKB diese Wirkung entfalten kann (Pap und Cooper, 1998 und zusammengefaßt in Khwaja, 1999). Es wird daher angenommen, daß Substanzen, die zu einer Akt/PKB-Aktivierung führen, auch eine antiapoptotische Eigenschaft besitzen.

Wie auch bei anderen Proteinkinasen ist die Aktivierung der Akt/PKB mit der Phosphorylierung spezifischer Aminoacylreste assoziiert. Dies sind im Falle der humanen Akt1/PKB $\alpha$  T308 bzw. S473, die durch die katalytische Aktivität der PDK1 bzw. der hypothetischen PDK2 (Alessi *et al.*, 1997) oder der MAPKAP Kinase 2 (Alessi *et al.*, 1996) phosphoryliert werden. Die Menge der phosphorylierten Akt/PKB kann im Western-Blot mit einem dafür spezifischen Antikörper nachgewiesen und so ihre Aktivität analysiert werden. Der hier verwendete Antikörper (New England Biolabs) erkennt spezifisch nur die an S473 phosphorylierte Form der humanen Akt1/PKB $\alpha$  und zeigt eine Kreuzreaktivität mit entsprechend phosphorylierten Homologen der Ratte (New England Biolabs), von denen zumindest eine, nämlich RAC-PK $\gamma$ /PKB $\gamma$ , kloniert wurde (Konishi *et al.*, 1995).

Bei der Identifizierung der Phospho-Akt/PKB-spezifischen Bande ergab sich das Problem, daß dafür zwei etwa gleich starke Banden im Bereich des Molekulargewichts von ca. 60 kDa in Frage kamen. Aus der Tatsache, daß nur eine von beiden, die niedermolekulare, induzierbar war, wurde geschlossen, daß es sich hierbei um die Phospho-Akt/PKB-spezifische Bande handelte.

Abbildung 4-10 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Akt/PKB-Phosphorylierung, die für ihre enzymatische Aktivierung indikativ ist. Im Falle der Insulin-Behandlung zeigte sich eine kräftige Zunahme des Signals, das in der 1-stündig behandelten Probe maximal ausgeprägt war (ca. 30-fach gegenüber der Kontrolle) und anschließend wieder abnahm. In allen Insulin-behandelten Proben war die Akt/PKB-Phosphorylierung deutlich stärker als in den beiden unbehandelten Kontrollproben nach 15 min und 24 h, in denen sich das spezifische Signal kaum vom unspezifischen Hintergrundsignal abhob. Die knapp über der Phospho-Akt/PKB-spezifischen Bande liegende, nicht identifizierte Bande war in allen Proben als schwaches Signal zu erkennen und zeigte keine Veränderung ihrer Intensität. Aus dem Vorhergehenden ergibt sich, daß Insulin eine sehr deutliche Aktivierung der Akt/PKB bewirkte.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in Dexamethason- und Phenobarbital-behandelten Zellen keine erkennbare, wesentliche Veränderung der Akt/PKB-Phosphorylierung: Die spezifische Bande war hier in behandelten wie in unbehandelten Zellen etwa gleich intensiv oder etwas schwächer als die nicht identifizierte Bande mit dem etwas höheren Molekulargewicht. Dexamethason und Phenobarbital hatten demzufolge keinen Einfluß auf die Aktivität von Akt/PKB.



**Abbildung 4-10: Western-Blot: S473-Phosphorylierung von Akt/PKB.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat die angegebene Zeit (15 min bis 24 h) mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin oder 2 mM Phenobarbital inkubiert. Je Spur wurden 20 µg Protein des Gesamtzellhomogenats aufgetragen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit CDP-Star durchgeführt und mit einer CCD-Kamera detektiert, bis das Signal im Bereich der spezifischen Bande der Sättigung nahe war. Gezeigt sind hier repräsentative Ergebnisse mehrerer durchgeführter Western-Blots. Die Lage der unteren, spezifischen Bande zeigt ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa an. Die Herkunft der knapp darüber liegenden Bande konnte nicht ausgemacht werden. Abkürzungen und Symbole: t: Inkubationszeit; +: Behandlung mit der angegebenen Substanz; -: Behandlung mit korrespondierendem Lösungsmittel.

### **4.7 Die Modulation des zellulären Bax-Gehalts durch Apoptoseinhibitoren**

Bax ist ein proapoptotisches Bcl-2-Protein. Das Hauptprodukt des *bax*-Gens ist Bax<sub>α</sub> mit einem Molekulargewicht von etwa 21 kDa, das hier untersucht wurde. Es fördert die Apoptose, indem es die Geschwindigkeit des Eintritts in die Apoptose erhöht und andere, schützende Faktoren wie *bcl-2*-Überexpression hemmt. Da es aufgrund seiner direkten Wechselwirkung mit Bcl-2 entdeckt wurde, entstand die Meinung, daß das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax darüber entscheidet, ob eine Zelle apoptotisch abstirbt oder nicht (Oltvai *et al.*, 1993). Allgemeiner könnte das Verhältnis antiapoptotischer zu proapoptotischen Bcl-2-Proteinen entscheidend sein. *Bax*-Expression ist in Organen adulter Mäuse recht weit verbreitet und wird auch in Hepatocyten der Maus gefunden (Krajewski *et al.*, 1994a). Homozygote *bax*-null-Mäuse sind vital und zeigen eine nahezu normale Entwicklung (Knudson *et al.*, 1995).

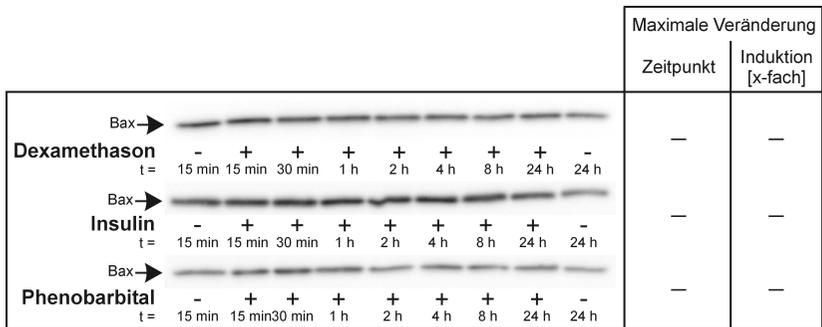
Die *bax*-Promoterregion beinhaltet vier Bindungsstellen für den Tumorsuppressor p53, welcher infolge einer DNA-Schädigung mit ionisierenden Strahlen die *bax*-Expression sehr schnell erhöht (zusammengefaßt bei Hale *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen legen nahe, daß es sich bei Bax selbst um einen Tumorsuppressor handelt und daß dessen Mutation die Karzinogenese in Abwesenheit von p53-Mutationen beschleunigt (Rampino *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997).

Zur Aufklärung der molekularen Wirkung einer erhöhten Bax-Expression trugen in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Erkenntnissen bei. Bax induziert mitochondrialen Schaden und Zelltod, selbst wenn Caspasen gehemmt sind. Bax verursacht den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, PT-Porenöffnung und die Freisetzung von Cytochrom c (z.B. Xiang *et al.*, 1996; Wolter *et al.*, 1997; Rossé *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1998; Pastorino *et al.*, 1998; Jürgensmeier *et al.*, 1998). Dies könnte mit der Fähigkeit von Bax, Ionenkanäle zu bilden, zusammenhängen (Antonsson *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997), wobei aber Bax erst in Kooperation mit ANT einen Atractylosid-responsiven Ionenkanal bildet (Marzo *et al.*, 1998), was den Zusammenbruch des Transmembranpotentials erklären könnte. Bax fördert außerdem den Durchtritt von Cytochrom c durch das in der äußeren Mitochondrienmembran gelegene VDAC (Shimizu *et al.*, 1999), was seinerseits zur Aktivierung von Caspasen im Cytosol und zu Apoptose führt (Li, P. *et al.*, 1997).

Bax wird im Laufe der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose nicht induziert (Selvakumaran *et al.*, 1994). Daher ist eine Möglichkeit der Wirkung antiapoptotischer Substanzen die Verminderung der Bax-Expression. Dies würde das Verhältnis der antiapoptotischen zu den proapoptotischen Bcl-2-Proteinen zugunsten der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine verschieben und somit eine verminderte Apoptoseneigung der Zellen bewirken. Dies

wurde hier durch eine Western-Blot-Analyse untersucht. Der verwendete Bax-Antikörper (Santa Cruz) erkennt spezifisch Bax und führt im Western-Blot zu einem Signal, dessen Lage das für Bax zu erwartende Molekulargewicht von etwa 21 kDa anzeigt.

Abbildung 4-11 faßt die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bax-Expression in FTO-2B-Zellen zusammen. Man erkennt, daß keine der drei Substanzen Dexamethason, Insulin oder Phenobarbital eine deutliche Auswirkung auf die Bax-Expression hatte: Die Bandenstärken von Proben behandelter Zellen und von Proben unbehandelter Zellen waren jeweils etwa gleich.



**Abbildung 4-11: Western-Blot: Bax-Expression.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat die angegebene Zeit (15 min bis 24 h) mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin oder 2 mM Phenobarbital inkubiert. Je Behandlung wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Je Spur wurde 1 µg Protein des Gesamtzellhomogenats aufgetragen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit CDP-Star durchgeführt und mit einer CCD-Kamera detektiert, bis das Signal im Bereich der spezifischen Bande der Sättigung nahe war. Gezeigt sind hier repräsentative Ergebnisse mehrerer Western-Blots. Die Lage der Bande zeigte ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa an. Abkürzungen und Symbole: t: Inkubationszeit; +: Behandlung mit der angegebenen Substanz; -: Behandlung mit korrespondierendem Lösungsmittel.

#### **4.8 Die Modulation des zellulären Bcl-x<sub>L</sub>-Gehalts durch Apoptoseinhibitoren**

Das *bcl-x*-Gen kann mit seinen beiden Spleißvarianten Apoptose sowohl negativ (Bcl-x<sub>L</sub>, 27 kDa) als auch positiv (Bcl-x<sub>S</sub>, 19 kDa) regulieren (Boise *et al.*, 1993). Unterschiedliche Gewebe zeigen unterschiedliche Expressionen der beiden *bcl-x*-Formen. Die meisten Gewebe exprimieren *bcl-x<sub>L</sub>*, aber Gewebe mit einer hohen Apoptoserate exprimieren auch *bcl-x<sub>S</sub>* (zusammengefaßt bei Hale *et al.*, 1996). Hepatocyten der Maus zeigen keine bis mittlere Immunreaktivität auf anti-Bcl-x-Antikörper (Krajewski *et al.*, 1994b). *Bcl-x<sub>S</sub>*-mRNA konnte in keinem Mausgewebe nachgewiesen werden. Die mRNA von *bcl-x<sub>L</sub>* dagegen ist außer in Lymphknoten in allen adulten Geweben der Maus vorhanden und wird dabei stärker exprimiert als *bcl-2* (González-García *et al.*, 1994).

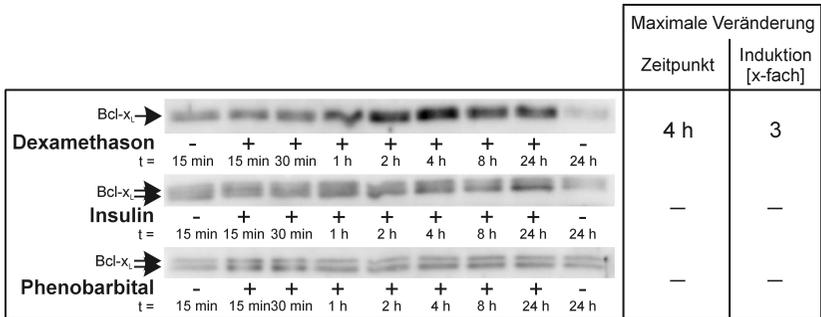
In bezug auf Krebs ist interessant, daß in späteren Phasen der Tumorentwicklung, in denen man nach einem Anstieg wieder ein Absinken der Apoptoseraten findet, Bcl-x<sub>L</sub> häufig stärker exprimiert ist als zu Beginn des Prozesses. Diese Veränderung ist *p53*-unabhängig (Naik *et al.*, 1996).

Eine Vielzahl molekularer Mechanismen der antiapoptotischen Wirkung von Bcl-x<sub>L</sub> wird diskutiert, worauf in der Einleitung ausführlich eingegangen wurde (s. Kap. 1.3.3).

Der hier verwendete Antikörper erkennt die Proteine beider Spleißvarianten des *bcl-x*-Transkripts. Jedoch wurde in keiner der analysierten Proben ein Bcl-x<sub>S</sub>-Signal gefunden, weswegen auf eine Darstellung dieser Daten verzichtet wurde. Ausschließlich Bcl-x<sub>L</sub>-Signale sind hier gezeigt. Dabei wies der Antikörper eine so ausgezeichnete Spezifität auf, daß auf dem gesamten Blot nur die hier gezeigten Signale erschienen.

In Abbildung 4-12 sind die Ergebnisse zusammengefaßt, die zur Bcl-x<sub>L</sub>-Expression in FTO-2B-Zellen erzielt wurden. Dabei fällt zunächst auf, daß einige der Blots eine Doppelbande im fraglichen Molekulargewichtsbereich zeigen. Diese Doppelbande wird auch von anderen Autoren gefunden (Krajewski *et al.*, 1994b) und rührt vermutlich von der Phosphorylierung des Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins her. Und so, wie in dieser Arbeit nicht in allen Blots eine Doppelbande gefunden wurde, so findet sich auch Literatur, in der nur eine einfache Bande detektiert wurde (González-García *et al.*, 1994).

Insulin und Phenobarbital zeigten sich in bezug auf die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression weitgehend neutral: Infolge der Inkubation mit diesen Substanzen veränderten sich die Bcl-x<sub>L</sub>-spezifischen Signale nicht wesentlich.



**Abbildung 4-12: Western-Blot: Bcl-x<sub>L</sub>-Expression.** FTO-2B-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat die angegebene Zeit (15 min bis 24 h) mit 10 nM Dexamethason, 100 nM Insulin oder 2 mM Phenobarbital inkubiert. Je Behandlung wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Je Spur wurde 1 µg Protein des Gesamtzellhomogenats aufgetragen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit CDP-Star durchgeführt und mit einer CCD-Kamera detektiert, bis das Signal im Bereich der spezifischen Bande der Sättigung nahe war. Gezeigt sind hier repräsentative Ergebnisse mehrerer Western-Blots. Die Lage der Bande zeigte ein Molekulargewicht von knapp 30 kDa an. Abkürzungen und Symbole: t: Inkubationszeit; +: Behandlung mit der angegebenen Substanz; -: Behandlung mit korrespondierendem Lösungsmittel.

Nur die Behandlung mit Dexamethason hatte eine deutlich Veränderung der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression zur Folge: Ein Anstieg der Expression war bereits nach 1 h erkennbar und die Expression erreichte ihren Höhepunkt in der Probe, die eine Behandlungszeit von 4 h aufwies. In dieser Zeit hatte sich die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression etwa verdreifacht. In der Folgezeit blieb die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression deutlich erhöht, auch nach 24 h Behandlung mit Dexamethason zeigte sich gegenüber den Kontrollproben ein deutlich stärkeres Bcl-x<sub>L</sub>-Signal.

### 4.9 Zusammenfassung der Untersuchung allgemein antiapoptotischer Mechanismen

Abbildung 4-13 faßt die Ergebnisse zusammen, die bei der Untersuchung allgemeiner, potentiell antiapoptotischer Mechanismen erhalten wurden, wie sie in den Kapiteln 4.4 bis 4.8 beschrieben sind.

Während für Phenobarbital keine Anhaltspunkte für den Mechanismus seines antiapoptotischen Potentials gefunden werden konnte, aktivierte Insulin die Signalwege der Proteinkinasen ERK1/2, JNK und Akt/PKB, wogegen Dexamethason die Expression des Apoptose-supprimierenden Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins induzierte. Die Expression von Bax wurde durch keine der drei untersuchten Substanzen beeinflusst.

Behandlung		-	+	+	+	+	+	+	+	-	Maximale Änderung	
Inkubationsdauer [h]		¼	¼	½	1	2	4	8	24	24	Zeitpunkt [h]	Induktion [x-fach]
Phospho-ERK1/2	Dexa										-	-
	Insulin										¼	6
	PB										-	-
Phospho-c-Jun	Dexa										-	-
	Insulin										½	3.5
	PB										-	-
Phospho-PKB/Akt	Dexa										-	-
	Insulin										1	30
	PB										-	-
Bax	Dexa										-	-
	Insulin										-	-
	PB										-	-
Bcl-x <sub>L</sub>	Dexa										4	3
	Insulin										-	-
	PB										-	-

Abbildung 4-13: Zusammenfassung der an FTO-2B-Zellen erhaltenen Ergebnisse zur Aktivierung von Proteinkinasen und zur Expression von Proteinen der Bcl-2-Familie. Abkürzungen: Dexa: Dexamethason; PB:Phenobarbital.

#### **4.10 Bedeutung der Cytochrom c-Freisetzung in der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose**

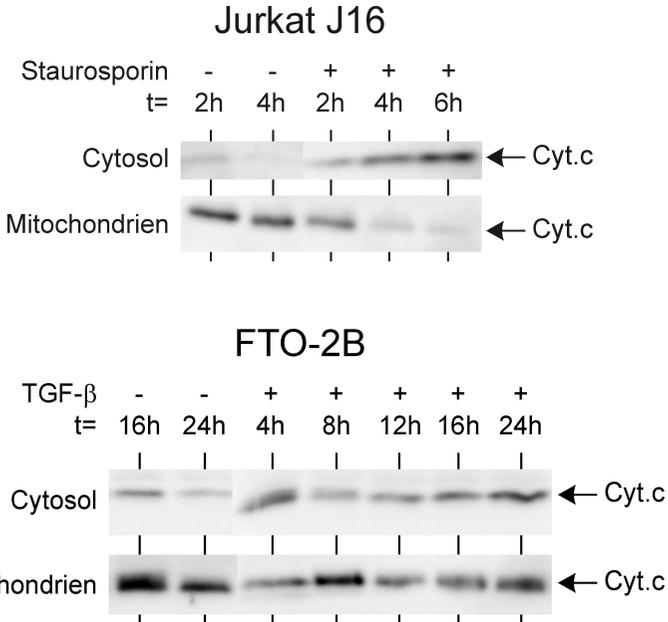
Die Freisetzung von Cytochrom c (Liu *et al.*, 1996) aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Cytosol führt zur Aktivierung von Caspasen und damit zu Apoptose (Li, P. *et al.*, 1997). Sie scheint mit der Freisetzung anderer Proteine einherzugehen, die daraufhin ihr proapoptotisches Potential entfalten können (Susin *et al.*, 1996; Mancini *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999a; Susin *et al.*, 1999b). Das proapoptotische Potential des Cytochrom c scheint dabei darin zu bestehen, daß es zunächst zu einer Aktivierung der Caspase-9 führt, die ihrerseits weitere, ihr nachgeschaltete Pro-Caspasen aktiviert, u.a. auch Pro-Caspase-3 (Li, P. *et al.*, 1997; Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Sollte der Prozeß der Relokalisation des Cytochrom c bei der Aktivierung der Pro-Caspase-3 in FTO-2B-Zellen eine bedeutende Rolle spielen, so war mit ihr gleichzeitig mit oder bereits vor der Aktivierung von Pro-Caspase-3 zu rechnen, also spätestens nach 12 h: Zu diesem Zeitpunkt wurde unter den Bedingungen, die auch in den hier durchgeführten Versuchen galten, Caspase-3-ähnliche Enzymaktivität gemessen (Buchmann *et al.*, 1999).

Eine Freisetzung von Cytochrom c wurde in zahlreichen zellulären Systemen beobachtet, so daß anfangs vermutet wurde, es könnte sich hierbei um einen universellen Mechanismus der Apoptoseinduktion handeln. Sehr bald jedoch wurde festgestellt, daß es vom eingesetzten Apoptoseinduktor und vom Zelltyp abhängig ist, ob unter Apoptose eine Freisetzung von Cytochrom c auftritt (Tang *et al.*, 1998b). Daher war es zunächst notwendig zu klären, ob die Cytochrom c-Freisetzung bei TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose der FTO-2B-Zellen eine Rolle spielt. Als Positivkontrolle diente dabei die Staurosporin-induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien von Jurkat-T-Zellen, die aus der Literatur bekannt war (z.B. Bossy-Wetzel *et al.*, 1998).

Zum Nachweis der Cytochrom c-Freisetzung aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Cytosol wurde zunächst eine Zellfraktionierung durchgeführt, bei der nach Aufschluß der Zellen Kerne und Zellfragmente entfernt und anschließend die Mitochondrienfraktion vom Cytosol getrennt wurde (s. Kap. 3.4). Diese beiden Fraktionen wurden anschließend im Western-Blot auf ihren jeweiligen Cytochrom c-Gehalt untersucht (s. Kap. 3.5).

In Abbildung 4-14 (oben) ist das Ergebnis der Western-Blot-Untersuchung der Cytochrom c-Freisetzung in Jurkat J16-T-Zellen dargestellt. In unbehandelten Zellen fand sich in der Cytosolfraktion nach 2 h und nach 4 h nur eine sehr geringe Menge an Cytochrom c. Dagegen befand sich in der Cytosolfraktion der mit 2.5  $\mu$ M Staurosporin behandelten Jurkat-Zellen bereits nach 2 h eine etwas erhöhte Cytochrom c-Menge, die mit zunehmender Behandlungszeit (4 h und 6 h) sukzessive zunahm. Das inverse Ergebnis

wurde für die Mitochondrienfraktion erhalten: Im Vergleich zu den zur Kontrolle 2 h und 4 h mit Lösungsmittel behandelten Zellen zeigten die mit 2.5 µM Staurosporin behandelten Mitochondrien der T-Zellen schon nach 2 h einen etwas geringeren Gehalt von Cytochrom c, der nach 4 h und 6 h Behandlungszeit weiter deutlich abnahm.

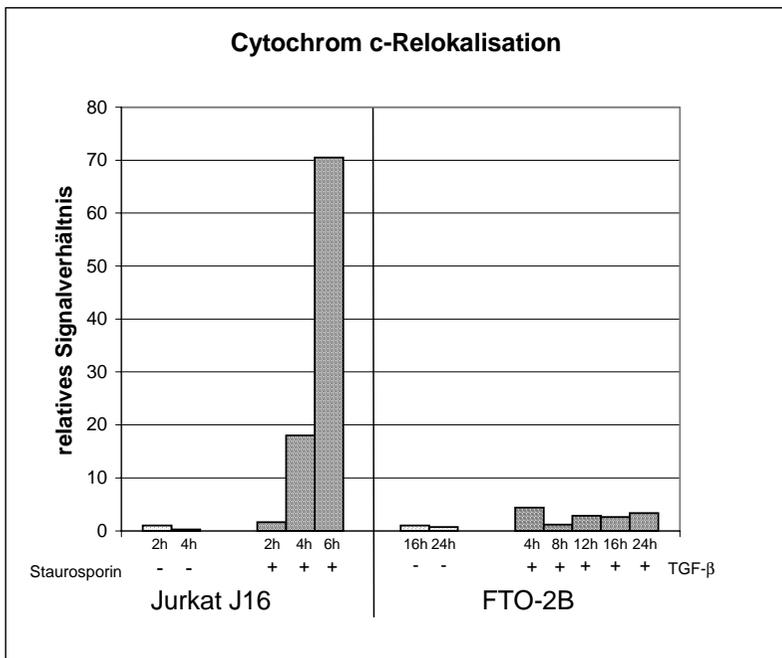


**Abbildung 4-14: Western-Blot: Cytochrom c in Cytosol- und Mitochondrienfraktion.** Jurkat J16- bzw. FTO-2B-Zellen wurden die angegebene Zeit (2 h bis 6 h bzw. 4 h bis 24 h) mit 2.5 µM Staurosporin bzw. 5 <sup>ng/ml</sup> TGF-β inkubiert. 150 µg Protein der Cytosolfraction wurden aufgetragen. Von der Mitochondrienfraktion wurden 10 % bzw. 20 % desjenigen Anteils an der Gesamtfraction aufgetragen, der von der Cytosolfraction aufgetragen wurde. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit CDP-Star durchgeführt und mit einer CCD-Kamera solange detektiert, bis das Signal im Bereich der spezifischen Bande der Sättigung nahe war. Die Bandenlage der unteren, spezifischen Bande zeigte ein Molekulargewicht von ca. 12 kDa an. Abkürzungen und Symbole: t: Inkubationszeit; Cyt.c: Cytochrom c; +: Behandlung mit 2.5 µM Staurosporin (Jurkat J16) bzw. 5 <sup>ng/ml</sup> TGF-β (FTO-2B); -: Behandlung mit Lösungsmittel.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Cytochrom c-Freisetzung an FTO-2B-Zellen sind in Abbildung 4-14 unten gezeigt. Hier wurde deutlich, daß sich die deutlichen Effekte einer Cytochrom c-Relokalisation, wie sie in Jurkat J16-Zellen gefunden wurde, in FTO-2B-Zellen nicht zeigten. In der Cytosolfraction nahm der Cytochrom c-Gehalt nicht auf ein

Vielfaches des Gehalts in unbehandelten Proben zu und die Mitochondrienfraktion verlor durch die TGF- $\beta$ -Behandlung nicht den Großteil des Cytochrom c, wie es in den Staurosporin-behandelten T-Zellen der Fall war.

Zur weiteren Veranschaulichung der unterschiedlichen Ergebnisse an Jurkat- und an FTO-2B-Zellen (s. Kap. 6.2.4, Tab. 9) wurde aus den Signalstärken der Cytochrom c-Banden der Cytosol- und der Mitochondrienfraktion der Quotient gebildet und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 4-15). Dabei zeigte sich, daß sich dieses Verhältnis in TGF- $\beta$ -behandelten FTO-2B-Zellen im Durchschnitt schwach, aber signifikant erhöhte (ca. 3-fach,  $p < 0.03$ ), aber keinen Anstieg mit zunehmender Behandlungsdauer zeigte.



**Abbildung 4-15: Signalverhältnis der Cytochrom c-Banden.** Die Signalstärke der Banden (Abb. 4-14) wurde quantifiziert (s. Kap. 3.5.7) und das Verhältnis des cytosolischen Signals zu dem der Mitochondrienfraktion gebildet. Die aus Jurkat J16- bzw. FTO-2B-Zellen erhaltenen Verhältnisse wurden normiert, indem sie zu dem Wert der unbehandelten Zellen nach 2 h (Jurkat J16) bzw. 16 h (FTO-2B) ins Verhältnis gesetzt wurden (relatives Signalverhältnis). Symbole: +: Behandlung der Zellen mit 2.5  $\mu\text{M}$  Staurosporin (Jurkat J16) bzw. 5  $\text{ng}/\text{ml}$  TGF- $\beta$  (FTO-2B); -: Kontrollbehandlung mit Lösungsmittel.



## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob im Apoptosemechanismus von Hepatomzellen ein universeller Angriffspunkt für Tumorpromotoren existiert. Ein solcher, universeller Angriffspunkt würde einen exzellenten, biologischen Endpunkt eines Testsystems auf tumorpromovierende Eigenschaften einer Substanz darstellen.

Als biologisches Modell für diese Untersuchung diente die TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose von Hepatomzellen. TGF- $\beta$  selbst kann in hepatischen Systemen der Ratte aufgrund seiner proapoptotischen (Oberhammer *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1998; Buchmann *et al.*, 1999) und antimitogenen Wirkungen (Sporn *et al.*, 1986; Carr *et al.*, 1986; McMahon *et al.*, 1986; Wollenberg *et al.*, 1987; Russell *et al.*, 1988; Thoresen *et al.*, 1992; Roberts und Sporn, 1990; Massagué *et al.*, 1990) tumorsupprimierende Eigenschaften entfalten. Bestätigt wird die Hypothese, TGF- $\beta$  sei ein Tumorsuppressor in der Leber von Nagern (Tang *et al.*, 1998a), durch Untersuchungen, die zeigten, daß der TGF- $\beta$ -Signalweg im Laufe der Kanzerogenese gehemmt oder ganz abgestellt wird. Dies scheint, durch ganz unterschiedliche molekulare Mechanismen verursacht, auch in verschiedenen anderen Geweben der Fall zu sein. Gehemmt wird der TGF- $\beta$ -Signalweg in Tumorzellen durch die Hemmung der für die biologische Aktivierung notwendigen Prozessierung des TGF- $\beta$ -Proteins (Jirtle *et al.*, 1994; Sue *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1995), durch Mutation des TGF- $\beta$ -spezifischen Rezeptors (Garrigue-Antar *et al.*, 1995; Markowitz *et al.* 1995) bzw. durch dessen verminderte Expression (Inagaki *et al.*, 1993; Reisenbichler *et al.*, 1994; Sue *et al.*, 1995; Bedossa *et al.*, 1995; Kiss *et al.*, 1997) oder durch eine Hemmung auf Ebene der Smad-Proteine (Hahn *et al.*, 1996), die die intrazelluläre, transkriptionelle TGF- $\beta$ -Antwort vermitteln (Zhang und Dernyck, 1999).

Tumorpromotoren fördern die Kanzerogenese, indem sie in Tumovorläuferzellen das Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod so stören, daß Zellteilung überwiegt. Ihre biologische Wirkung ist dabei der des TGF- $\beta$  in Hepatocyten genau entgegengesetzt: Tumorpromotoren regen diese Zellen zu schnellerer Zellteilung an, hemmen deren Apoptose oder wirken über einen Synergismus beider Effekte. Auf diese Weise erhält die initiierte Zelle einen Selektionsvorteil gegenüber unveränderten Zellen (Schulte-Hermann *et al.*, 1981; Schulte-Hermann *et al.*, 1983; Schulte-Hermann *et al.*, 1990; Lucier *et al.*, 1991; Bayly *et al.*, 1994; Stinchcombe *et al.*, 1995; Kolaja *et al.*, 1996a). Viele Untersuchungen zur Kanzerogenese und zur Tumorpromotion wurden an der Leber durchgeführt, weil sich in ihr die Nachkommen initiiertter Zellen bereits in frühen Entwicklungsstadien morphologisch und funktionell recht gut charakterisieren lassen (Schulte-Hermann, 1985).

### **5.1 Die antiapoptotische Aktivität von Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt verschiedener Substanzen auf die durch TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose von FTO-2B-Hepatomzellen mittels Durchflußcytometrie bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst in einem hypotonen, Detergenzien-haltigen Puffer inkubiert, der Propidiumiodid enthielt. Dadurch wurden die Kerne aus den Zellen freigesetzt, deren DNA daher durch Interkalation des Propidiumiodids markiert werden konnte. Der DNA-Gehalt der so gefärbten Kerne konnte dann aufgrund der fluorogenen Eigenschaften des Propidiumiodids in einem Cytofluorometer analysiert werden. Diese Methode von Fried *et al.* (1978) zur Analyse des DNA-Gehalts wurde speziell für adhärent wachsende Zellen entwickelt, wie es auch die Zellen der hier untersuchten Hepatomlinien FTO-2B und HepG2 sind. Nicoletti *et al.* (1991) entwickelten auf Grundlage dieser Arbeit eine Methode, Apoptose zu analysieren. Dabei machten sie sich die Tatsache zunutze, daß Kerne apoptotischer Zellen aufgrund der im Apoptose-Prozeß aktivierten DNasen einen geringeren DNA-Gehalt aufweisen als Kerne aus Zellen nicht-apoptotischer Herkunft. Im Histogramm des DNA-Gehalts einer Probe von apoptotischen Zellen erscheint deshalb ein Signal unterhalb des diploiden Signals von Zellen, die ruhen oder sich nach einer Mitose auf eine weitere Runde der DNA-Replikation vorbereiten ( $G_0/G_1$ -Phase). Dieses subdiploide Signal kann quantifiziert werden und liefert damit ein Maß für die Zahl apoptotischer Zellen in einer Probe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit an FTO-2B-Zellen bestätigen die Ergebnisse früherer Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich der Apoptose-hemmenden Eigenschaften aller vier hier untersuchten Substanzen, namentlich von Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin (Buchmann *et al.*, 1999). Die Messung subdiploider Kerne im Cytofluorometer scheint daher als schnelle und empfindliche Methode zur Apoptosebestimmung geeignet zu sein.

Eine kürzlich erschienene Untersuchung bestätigt die von uns gefundene, antiapoptotische Wirkung von Dexamethason in Rattenhepatomzellen (Yamamoto *et al.*, 1998). Von einer antiapoptotischen Wirkung in der Leber *in vivo* oder einer tumorpromovierenden Wirkung des Dexamethason in diesem Organ ist bisher nichts bekannt.

Die Apoptose-hemmende Wirkung von Insulin in der Leber wurde bisher vor allem in Arbeiten an Hepatomzellen des Menschen gezeigt (Chuang *et al.*, 1994; Tanaka und Wands, 1996; Chen *et al.*, 1997). Wir konnten diese Wirkung auch an Hepatomzellen der Ratte zeigen (Buchmann *et al.*, 1999). Eine tumorpromovierende Eigenschaft von Insulin in der Rattenleber ist bisher nicht bekannt.

Die tumorpromovierende Eigenschaft von Phenobarbital (Peraino *et al.*, 1971) in der Leber von Nagern, die bei chronischer Behandlung beobachtet wird (Rossi *et al.*, 1977; Butler *et al.*, 1978, Kitagawa *et al.*, 1980, Goldsworthy *et al.*, 1984), wurde mit dessen antiapoptotischer Wirkung in der Rattenleber in Verbindung gebracht (Bursch *et al.*, 1984; Schulte-Hermann *et al.*, 1990). In dieser Arbeit wurde der Apoptose-supprimierende Phenobarbital-Effekt auch *in vitro* gezeigt.

Auch Dieldrin ist ein nicht gentoxisches Hepatokarzinogen (Ashwood-Smith, 1981), das vermutlich als Tumorpromotor aktiv ist (Tennekes *et al.*, 1981; Tennekes *et al.*, 1982; Kolaja *et al.*, 1996b). Während die hepatokarzinogene Wirkung von Dieldrin bei der Maus bereits häufig beschrieben werden konnte, ist die Datenlage bei der Ratte widersprüchlich (Fitzhugh *et al.*, 1964; Ito *et al.*, 1983), wobei zumeist in der Ratte kein hepatokarzinogener Effekt gefunden wurde. Eine Hemmung der Apoptose in der Rattenleber durch Dieldrin wurde *in vivo* bisher nicht beschrieben.

Insgesamt kann auch aufgrund der generellen Problematik bei der Übertragung von *in vitro*-Daten auf *in vivo*-Systeme aus den hier gewonnenen Daten kein direkter Zusammenhang zwischen antiapoptotischer Wirkung *in vitro* und tumorpromovierender Eigenschaft *in vivo* hergeleitet werden.

## **5.2 Der antimitogene Effekt von TGF- $\beta$ und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren**

TGF- $\beta$  wirkt in Hepatocyten durch einen Block des Zellzyklus an der G<sub>1</sub>/S-Grenze antimitogen (Inagaki *et al.*, 1993; Alevizopoulos und Mermod, 1997) und diese Wirkung geht häufig im Laufe der Kanzerogenese verloren (Jirtle *et al.*, 1994; Reisenbichler *et al.*, 1994; Sue *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1995; Bedossa *et al.*, 1995; Kiss *et al.*, 1997).

Die antimitogene Wirkung von TGF- $\beta$  scheint durch die Regulation der Expression verschiedener Gene vermittelt zu werden: Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk, *cyclin dependent kinase*) werden in Folge von TGF- $\beta$  verstärkt exprimiert, während verschiedene Cycline und Cdk reprimiert werden (zusammengefaßt bspw. in Alevizopoulos und Mermod, 1997). All dies trägt zur Hemmung des G<sub>1</sub>/S-Übergangs bei (Sherr, 1996).

Der Verlust der antimitogenen TGF- $\beta$ -Zellantwort im Laufe der Hepatokarzinogenese wurde mit verschiedenen Fehlfunktionen im TGF- $\beta$ -Signalweg in Verbindung gebracht: Die Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ -Komplexes wird durch eine geringere Aktivität des M6P/IGF2-Rezeptors reduziert oder die Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren ist vermindert (Jirtle *et al.*, 1994; Reisenbichler *et al.*, 1994; Sue *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1995; Bedossa *et al.*, 1995; Kiss *et al.*, 1997).

Hier sollte untersucht werden, ob eine antimitogene TGF- $\beta$ -Wirkung mit dessen Apoptose-induzierender Eigenschaft mechanistisch zusammenhängt. Dazu wurden zwei Zelllinien untersucht: FTO-2B und HepG2. Von FTO-2B-Zellen war bekannt, daß sie infolge einer TGF- $\beta$ -Behandlung Apoptose aufweisen, während sich HepG2-Zellen in dieser Hinsicht resistent gegenüber TGF- $\beta$  zeigen (Gressner *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1998).

Die FTO-2B-Linie reagierte auf TGF- $\beta$  mit einem gesteigerten Anteil ihrer Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und scheint daher für die antimitogene Wirkung des TGF- $\beta$  empfänglich zu sein. HepG2-Zellen hingegen zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur (Chapekar *et al.*, 1989) keine erkennbare Verschiebung der Zellzyklusverteilung. Demzufolge sind die Ergebnisse an FTO-2B- und HepG2-Zellen dahingehend konsistent, daß es einen mechanistischen Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose und dessen antimitogener Wirkung geben könnte, da diese Effekte nicht getrennt voneinander beobachtet wurden.

Vorangegangene Untersuchungen hatten ergeben, daß FTO-2B-Zellen nach TGF- $\beta$ -Gabe nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt gemeinsam in die Apoptose eintraten, sondern daß sich die Zahl der apoptotischen Zellen mit zunehmender Behandlungsdauer

## 5.2 Der antimitogene Effekt von TGF- $\beta$ und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren

erhöhte. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Beobachtung war die, daß im Zyklus der Zellteilung bestimmte Phasen existieren, in denen die Zellen besonders sensitiv für die Apoptoseinduktion durch TGF- $\beta$  sind. Das sukzessive Erreichen dieser sensitiven Phasen durch das Fortschreiten der Zellen im Zellteilungszyklus könnte deren asynchrones Eintreten in die Apoptose erklären. Antiapoptotische Substanzen könnten deshalb über eine Anreicherung von Zellen in weniger sensitiven Zellzyklusphasen wirksam werden. Eine deutliche Verschiebung des Zellzyklus durch Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin konnte allerdings nicht beobachtet werden. Weitere Versuche zur Zellsynchronisierung in unserer Arbeitsgruppe scheinen zu bestätigen, daß Zellen nicht in einer spezifischen Zellzyklusphase in die Apoptose eintreten und daß Apoptoseinhibitoren vermutlich nicht dadurch wirksam werden, daß sie das Eintreten von Zellen in eine besonders Apoptose-sensitive Zellzyklusphase verhindern.

Neben der Hemmung der Apoptose kann auch die Förderung der Zellteilung initiiert Zellen zur Tumorpromotion beitragen (Schulte-Hermann *et al.*, 1981; Schulte-Hermann *et al.*, 1983; Schulte-Hermann *et al.*, 1990; Lucier *et al.*, 1991; Kolaja *et al.*, 1996a).

Die Untersuchung des Zellzyklus versprach daher Hinweise zur Beantwortung weiterer Fragen. Erstens: Wirken die vier untersuchten, antiapoptotischen Substanzen mitogen oder antimitogen? Ein mitogener Effekt würde auf eine zusätzliche, tumorpromovierende Eigenschaft hindeuten, ein antimitogener Effekt dagegen könnte einen Hinweis darauf geben, warum eine Substanz trotz Apoptose-hemmender Wirkung bisher nicht als Tumorpromotor auffiel. Zweitens: Können antiapoptotische Substanzen die antimitogene Wirkung von TGF- $\beta$  zumindest partiell aufheben? Die Antwort auf diese zweite Frage könnte Hinweise auf den mechanistischen Zusammenhang von apoptotischer und antimitogener TGF- $\beta$ -Antwort erbringen.

Die getesteten antiapoptotischen Substanzen zeigten unterschiedliche Wirkungen auf den Zellzyklus von FTO-2B-Zellen.

Dexamethason bewirkte in Übereinstimmung mit der Literatur (Yamamoto *et al.*, 1998) einen Anstieg der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und eine Abnahme in der S-Phase, was für eine antimitogene Wirkung charakteristisch ist. Dieser Effekt schien außerdem von einer TGF- $\beta$ -Behandlung unabhängig zu sein. Sollte dieser Dexamethason-Effekt auch *in vivo* auftreten, könnte dies einem tumorpromovierenden, antiapoptotischen Effekt dieser Substanz zuwider laufen.

Dieldrin dagegen führte zu einer Zunahme an Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Außerdem verhinderte Dieldrin die Veränderung der Zellzyklusverteilung durch TGF- $\beta$ , was auf ein Potential zur Hemmung einer antimitogenen TGF- $\beta$ -Wirkung hinweisen könnte. Sollte

sich das *in vivo* bestätigen lassen, könnte eine solche Dieldrin-Wirkung zu dessen tumorpromovierendem Potential beitragen.

Insulin und Phenobarbital verhielten sich in Bezug auf die Zellzyklusverteilung von FTO-2B-Zellen völlig indifferent und zeigten in dieser Hinsicht auch keinen signifikanten Einfluß auf die Wirkung von TGF- $\beta$ .

Diese Ergebnisse zeigen, daß TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose und Zellzyklusverteilung durch Dexamethason, Phenobarbital, Insulin und Dieldrin in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden: Während alle vier untersuchten Substanzen Apoptose supprimieren, war die Wirkung auf den Zellzyklus völlig uneinheitlich. Zusammengefaßt kann daher gesagt werden, daß die Inhibition der von TGF- $\beta$  verursachten Verschiebung der Zellzyklusverteilung im Sinne einer antimitogenen Wirkung keine allgemeine Eigenschaft von Apoptose-supprimierenden Agenzien zu sein scheint.

### 5.3 Untersuchung des Smad-Signalweges

Über den Smad-Signalweg (Zhang und Derynck, 1999) wird möglicherweise sowohl die antimitogene als auch die apoptotische TGF- $\beta$ -Wirkung vermittelt (Atfi *et al.*, 1997). Er stellt damit einen der möglichen, oben angesprochenen Angriffspunkte Apoptose-inhibierender Substanzen dar. In dieser Arbeit wurde mittels eines Reportergentests die Aktivierung des Smad-Signalwegs gemessen. Dabei fand ein Reportergenplasmid Verwendung, das im Promotorbereich des *firefly*-Luciferasegens mehrfache Kopien eines Smad-responsiven DNA-Elements enthielt (Jonk *et al.*, 1998).

Sowohl die Zellen der Linie FTO-2B als auch, in Übereinstimmung mit der Literatur (Jonk *et al.*, 1998), HepG2-Zellen wiesen eine Aktivierung des Smad-Signalweges auf. Da TGF- $\beta$  proapoptotische und antimitogene Zellantworten in FTO-2B-Zellen bewirkte, dagegen beides nicht in HepG2-Zellen, liegt der Schluß nahe, daß in HepG2-Zellen sowohl der apoptotische als auch der antimitogene Signalweg unabhängig von einer Smad-Aktivierung gehemmt ist. Im Falle der apoptotischen Wirkung könnte dies durch eine erhöhte Expression des *bcl-2*-Gens in HepG2-Zellen vermittelt werden (Huang und Chou, 1998).

Um Aufschluß darüber zu erhalten, wie die in dieser Arbeit eingesetzten Apoptoseinhibitoren auf den Smad-Signalweg wirken, wurde dessen Aktivierung unter Behandlung mit einer Kombination von Apoptoseinhibitor und TGF- $\beta$  untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß lediglich Insulin eine signifikante Reduktion der TGF- $\beta$ -induzierten Aktivierung des Smad-Reportergens bewirkte, während Dexamethason, Phenobarbital und Dieldrin diese sogar eher noch verstärkten. Es ist daher auszuschließen, daß die drei letzteren Substanzen ihre antiapoptotische Wirkung vor oder auf der Ebene des Smad-Signalweges ausüben. Insulin wirkt vermutlich über eine Aktivierung von ERK-Proteinkinasen, welche die für die TGF- $\beta$ -spezifische, transkriptionelle Genregulation zuständigen Smad-Proteine 2 und 3 an spezifischen Aminoacylresten phosphorylieren und so im Cytosol zurückhalten (Kretzschmar *et al.*, 1999).

Obwohl die Hemmung des Smad-Signalweges durch Insulin die antiapoptotische Aktivität des Hormons erklären könnte, ist bemerkenswert, daß in FTO-2B-Zellen keine Interferenz von Insulin mit TGF- $\beta$  auf Ebene des Zellzyklus festgestellt werden konnte. Auch eine Behandlung mit Insulin alleine hatte keine Auswirkung auf die Zellzyklusverteilung. Dafür kann es zwei Erklärungen geben: Entweder liegt die Schwelle des Smad-Signalweges für die antimitogene Wirkung noch unterhalb der verbliebenen Smad-Aktivität unter Insulin-Kombinationsbehandlung. Dies stünde in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß TGF- $\beta$  mitogene Effekte von Wachstumsfaktoren überwinden kann (Carr *et al.*, 1986).

Alternativ könnte die antimitogene Wirkung des TGF- $\beta$  in FTO-2B-Zellen unabhängig vom Smad-Signalweg sein.

Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß die antiapoptotische Insulinwirkung allein durch eine Hemmung des Smad-Signalwegs vermittelt wird. In kinetischen Untersuchungen zu dieser Wirkung wurde beobachtet, daß die volle antiapoptotische Wirkung von Insulin auch dann noch auftritt, wenn das Hormon 16 h nach TGF- $\beta$  zugegeben wird (Buchmann *et al.*, 1999). Dabei dürfte eine Hemmung der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen, die durch Smad-Proteine vermittelt wird, keine bedeutende Rolle mehr spielen, da zu diesem Zeitpunkt die transkriptionelle Antwort auf TGF- $\beta$  zumindest größtenteils abgeschlossen sein sollte. Dafür sprechen Ergebnisse von Vindevoghel *et al.* (1998), die zeigten, daß sich der spezifische Transkriptionskomplex bereits 3 h nach Beginn der TGF- $\beta$ -Behandlung vom Promotor des humanen Collagen Typ VII-Gens gelöst hatte sowie eigene Untersuchungen, die zeigten, daß nach 8 h TGF- $\beta$ -Inkubation bereits ein Großteil der TGF- $\beta$ -induzierten Reportergenaktivierung erfolgt war und zu späteren Zeitpunkten nur noch eine vergleichsweise geringe, zusätzliche Reportergeninduktion zu beobachten war. Schließlich scheint Insulin in Hep3B humanen Hepatomzellen Apoptose unabhängig von der Hemmung der Smad-Aktivität zu inhibieren (Chen *et al.*, 1998).

Unter der Voraussetzung, daß der Smad-Signalweg sowohl die apoptotische als auch die antimitogene Wirkung von TGF- $\beta$  vermittelt (Atfi *et al.*, 1997), läßt sich aus den vorliegenden Daten dieses und des vorhergehenden Kapitels zusammenfassend schließen, daß der Eingriff Apoptose-supprimierender Substanzen in den TGF- $\beta$ -Signalweg vermutlich erst nach der Aktivierung des Smad-Signalweges und erst nach der Trennung der apoptotischen und der antimitogenen TGF- $\beta$ -Signalwege erfolgt.

## 5.4 Aktivierung von Proteinkinasen

Die Aktivierung von Proteinkinasekaskaden führt in verschiedenen Zellsystemen zu anti-apoptotischen Wirkungen. Suppression von Apoptose durch die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen könnte demzufolge durch Aktivierung der entsprechenden Signalwege vermittelt werden. Im einzelnen wurden ERK1/2-, JNK- und Akt/PKB-abhängige Signalwege untersucht.

### 5.4.1 Aktivierung des ERK-Signalweges

Dem ERK-Signalweg werden mitogene (Kerkhoff und Rapp, 1998) und antiapoptotische (Xia *et al.*, 1995; Kinoshita *et al.*, 1995a; Kinoshita *et al.*, 1995b; Leverrier *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1997) Wirkungen zugesprochen. Somit ist dessen Aktivierung eine Möglichkeit, wie Apoptoseinhibitoren ihre Wirkung entfalten könnten.

Bekannte Aktivatoren des Ras/Raf/ERK-Weges sind vor allem Wachstumsfaktoren. Der Eintritt in diesen Signalweg kann über eine große Anzahl verschiedener Moleküle erfolgen (Whitmarsh und Davis, 1996; Sugden und Clerk, 1997) und Ras seinerseits führt zur Aktivierung einer Vielzahl weiterer Signalwege (Campbell *et al.*, 1998).

Von den drei untersuchten Substanzen war lediglich Insulin in der Lage, die Proteinkinasen ERK1/2 zu aktivieren. Der Zeitpunkt mit der höchsten gemessenen ERK1/2-Aktivierung lag bei 15 min nach Behandlungsbeginn. Nach diesem Meßzeitpunkt nahm das Signal deutlich ab. Die stärkste Signalinduktion betrug das 6-fache gegenüber den unbehandelten Kontrollproben.

Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Literatur zur Insulinwirkung. Nach Bindung von Insulin an seinen Rezeptor (IRK) ist dieser in der Lage, sich selbst an Tyrosinresten zu phosphorylieren. Die so gebildeten SH2- und PTB-Bindungsstellen werden von einer Vielzahl von Adapterproteinen erkannt, die infolge ihrer Bindung an den aktiven IRK das Insulinsignal weiterleiten. Die Aktivierung des Ras/Raf/ERK-Signalweges wird dabei über die Moleküle Shc2, Grb2 und SOS vermittelt, wodurch zunächst die GTPase Ras aktiviert wird. Dies führt seinerseits zur Aktivierung weiterer Signalmoleküle, u.a. der Proteinkinasen Raf, ERK1 und ERK2 (White, 1998; Ogawa *et al.*, 1998; Ceresa und Pessin, 1998; Avruch *et al.*, 1998).

Eine antiapoptotische Eigenschaft dieses Signalweges könnte mit der Phosphorylierung von BAD erklärt werden: Bcl-2 geleitet Raf-1 (eine MKKK) zum Mitochondrium, wo diese die Phosphorylierung von BAD bewirkt. Dies hemmt dessen proapoptotische Aktivität (Zha *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Außerdem können Ras/MKK/ERK den TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg über Phosphorylierung von Smad2/3 inhibieren (Kretzschmar *et al.*, 1999), was ebenfalls zur Hemmung der Apoptose beitragen könnte (s. Kap. 5.3).

#### **5.4.2 Aktivierung des JNK-Signalweges**

Dem JNK-Signalweg wird nur unter ganz bestimmten Umständen eine antiapoptotische Wirkung zugesprochen. Zumeist wird er mit der Streßantwort von Zellen oder mit der Signaltransduktion apoptotischer Signale in Zusammenhang gebracht (Whitmarsh und Davis, 1996; Ip und Davis, 1998; Dhanasekaran und Reddy, 1998).

Eine Aktivierung des JNK-Signalweges konnte nach einer Behandlung mit Insulin beobachtet werden. Das JNK-Substratprotein c-Jun wies 30 min nach Beginn der Insulinbehandlung die stärkste JNK-spezifische Phosphorylierung auf, dessen Signal etwa das 3.5-fache des Signals der Kontrollprobe betrug. Anschließend nahm das Ausmaß der c-Jun-Phosphorylierung wieder deutlich ab.

Von Insulin war bereits bekannt, daß es JNK aktivieren kann. An den Insulinrezeptor binden auch IRS-Proteine, an die weitere Proteine binden können, die hierdurch an der Signaltransduktion beteiligt werden. Zu diesen gehört PI3K, dessen Bindung an IRS-Proteine (außer an p62<sup>dok</sup>) unter anderem zur Aktivierung von Rac führt, welches seinerseits an der Aktivierung der MAP-Kinase JNK beteiligt ist (White, 1998; Ogawa *et al.*, 1998; Ceresa und Pessin, 1998; Avruch *et al.*, 1998).

Der Mechanismus, über den JNK Apoptose hemmt, ist bisher nicht bekannt. Zwar wurde eine antiapoptotische Wirkung von Rac (Boehm *et al.*, 1999) gezeigt, jedoch ist nicht klar, wie diese mit einer JNK-Aktivierung und dessen antiapoptotischer Funktion zusammenhängt. Allerdings wird der JNK-Signalweg aufgrund der vielfachen Quervernetzung verschiedenster Signalwege und der MAPK-Kaskaden auch von antiapoptotischen Stimuli aktiviert, so daß dessen Aktivität in dem hier untersuchten Fall nicht mit Sicherheit zum antiapoptotischen Effekt von Insulin beiträgt. Vielmehr könnte, wie in den meisten biologischen Systemen, die JNK-Aktivität auch hier eine potentiell apoptotische Wirkung entfalten (Whitmarsh und Davis, 1996; Ip und Davis, 1998; Dhanasekaran und Reddy, 1998), die jedoch aufgrund der im Vergleich zum ERK-Signalweg relativ geringen Induktion vermutlich von eher geringer funktioneller Bedeutung wäre. Für eine eher apoptotische Wirkung des JNK-Signalweges spricht außerdem, daß TGF- $\beta$  selbst JNK bspw. über TAK-1 oder Farnesyltransferase  $\alpha$  zu aktivieren scheint (Alevizopoulos und Mermod, 1997; Dhanasekaran und Premkumar Reddy, 1998).

### **5.4.3 Aktivierung der Proteinkinase Akt/PKB**

Die Aktivierung der Proteinkinase Akt/PKB führt in der Regel zur Verminderung von Apoptose (Ahmed *et al.*, 1997; Dudek *et al.*, 1997; Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997; Khwaja *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Akt/PKB-vermittelte Signale bei der antiapoptotischen Wirkung von Dexamethason, Insulin oder Phenobarbital eine Rolle spielen könnten.

Die Proteinkinase Akt/PKB wurde ausschließlich in Insulin-behandelten Zellen aktiviert. Das gemessene Phosphorylierungssignal nahm bis zum Meßzeitpunkt 1 h nach Beginn der Insulinbehandlung deutlich zu und betrug zu diesem Zeitpunkt das 30-fache des Signals in unbehandelten Kontrollproben. Diese Induktion war damit die stärkste, die bei den drei untersuchten Proteinkinasen gefunden wurde. Zu späteren Meßzeitpunkten war das Phosphorylierungssignal wieder deutlich verringert.

Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit der Literatur. PI3K bindet an das an den aktiven Insulin-Rezeptor gebundene IRS-1. Dadurch wird es in die Lage versetzt, seine Substrate umzusetzen, was in die Aktivierung der Proteinkinase Akt/PKB mündet (White, 1998; Ogawa *et al.*, 1998; Ceresa und Pessin, 1998; Avruch *et al.*, 1998).

Für die antiapoptotische Wirkung von Insulin in FTO-2B-Zellen könnte somit die Aktivierung von zwei Proteinkinasen verantwortlich sein: die der ERK1/2 und die der Akt/PKB. Chen *et al.* (1998) zeigten, daß der antiapoptotische Effekt von Insulin in der humanen Hepatomlinie Hep3B durch Akt/PKB und nicht durch ERK1/2 vermittelt wird, wobei die Apoptose-hemmende Wirkung des Akt/PKB-Signalweges unabhängig von einer Hemmung des Smad-Signalweges war. Wie genau diese beiden Signalwege zur Apoptosesuppression durch Insulin in FTO-2B-Zellen beitragen, ist nicht bekannt.

## **5.5 Expression von Bcl-2-Proteinen**

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind ein wesentlicher Bestandteil der zellulären Apoptoseregulation (Adams und Cory, 1998). In der Leber werden zwei der bestuntersuchten Bcl-2-Proteine exprimiert: das proapoptotische Bax (Krajewski *et al.*, 1994a) und das antiapoptotische Bcl-x<sub>L</sub> (Krajewski *et al.*, 1994b). Daher könnten antiapoptotische Substanzen ihre Wirkung über eine veränderte Expression dieser Proteine entfalten.

### **5.5.1 Bax-Expression**

Bax ist als proapoptotisches Bcl-2-Protein bekannt (Oltvai *et al.*, 1993). Als solches scheint es auch eine Funktion als Tumorsuppressor auszuüben (Rampino *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997). Es ist in der Lage, Zelltod auch unabhängig von einer Caspase-Aktivierung zu induzieren (Xiang *et al.*, 1996) und übt diese Wirkung aus, indem es die antiapoptotischen Aktivitäten des Bcl-2- und des Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins inhibiert (Oltvai *et al.*, 1993; Cosulich *et al.*, 1997; Diaz *et al.*, 1997) bzw. indem es Mitochondrien schädigt, was zu einer Cytochrom c-Freisetzung führt (Hsu *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998; Jürgensmeier *et al.*, 1998). Dabei scheinen auch Wechselwirkungen mit Molekülen der mitochondrialen PT-Pore eine entscheidende Rolle zu spielen (Martinou *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999; Marzo *et al.*, 1998).

Eine Erhöhung der Bax-Expression wurde bei p53-abhängiger und -unabhängiger Apoptose beobachtet, stellt allerdings keinen universellen Mechanismus der Apoptoseinduktion dar (Selvakumaran *et al.*, 1994; Miyashita und Reed, 1995; Hung und Chuang, 1996; Jiang *et al.*, 1996; Bünemann, 1997). Auch bei TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose war kein Anstieg des zellulären Bax-Gehalts nachweisbar (Selvakumaran *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit war die Bax-Expression in FTO-2B-Zellen durch Dexamethason, Insulin oder Phenobarbital nicht beeinflusst. Diese Substanzen übten ihre antiapoptotische Wirkung demzufolge nicht über eine Verminderung der Bax-Expression aus. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von Yamamoto *et al.* (1998), die unter Dexamethason keine Veränderung der Bax-Expression in Rattenhepatomzellen nachweisen konnten.

### **5.5.2 Bcl-x<sub>L</sub>-Expression**

Bcl-x<sub>L</sub> ist ein antiapoptotisch wirkendes Bcl-2-Protein (Boise *et al.*, 1993), welches seine Wirkung vor allem über die Hemmung des apoptotischen Cytochrom c-Mechanismus (Antonsson *et al.*, 1997; Kharbanda *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 1997; Li, F. *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997; Yang J. *et al.*, 1997; Brustugun *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999; Martinou, 1999; Shimizu *et al.*, 1999) sowie durch Inhibition der Caspase-Aktivierung an Caspase-aktivierenden Komplexen auszuüben scheint (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Chaudhary *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998). Eine Erhöhung seiner Expression hatte in einer Vielzahl von Zellsystemen eine Hemmung der Apoptose zur Folge.

Die Untersuchung im Western-Blot ergab, daß Insulin und Phenobarbital in FTO-2B-Zellen keinen Einfluß auf die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression ausübten. Dexamethason jedoch bewirkte eine etwa 3-fache Induktion des Bcl-x<sub>L</sub>-Signals, die nach 4 h Behandlung erreicht war und in der Folge bestehen blieb.

Die verstärkte Expression von Bcl-x<sub>L</sub> unter dem Einfluß von Dexamethason wurde außer an Rattenhepatomzellen auch an Magenkrebszellen gezeigt und war in diesen Fällen mit einer antiapoptotischen Wirkung assoziiert (Chang *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1998). Die Bcl-x<sub>L</sub>-Wirkung liegt mechanistisch gesehen direkt vor der Aktivierung von Caspasen (s.o.). Dies könnte erklären, weshalb Dexamethason auch noch zu einem sehr späten Zeitpunkt während der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose supprimierend eingreift (Buchmann *et al.*, 1999). Der direkte Nachweis einer Verbindung zwischen gesteigerter Bcl-x<sub>L</sub>-Expression und der antiapoptotischen Dexamethason-Wirkung steht allerdings noch aus.

### **5.6 Bedeutung der Cytochrom c-Freisetzung**

Cytochrom c gehört zu den Proteinen, die unter Apoptosestimulation aus dem Intermembranraum des Mitochondriums freigesetzt werden und im Cytosol eine proapoptotische Aktivität entwickeln (Liu *et al.*, 1996). Diese scheint durch die Prozessierung der Pro-Caspase-9 vermittelt zu werden, vermutlich durch Bildung des Säuger-Analogons des Apoptosoms in *C. elegans* (Hengartner, 1997), einem Proteinkomplex aus Cytochrom c, Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997) und Pro-Caspase-9. Die hierdurch initiierte Caspase-Kaskade führt schließlich zu Apoptose (Li, P. *et al.*, 1997).

Cytochrom c-Freisetzung wurde nach einer Vielzahl von Stimuli beobachtet (bspw. Vander Heiden *et al.*, 1997; Kuwana *et al.*, 1998; Bossy-Wetzel *et al.*, 1998; Jürgensmeier *et al.*, 1998). Daraus wurde geschlossen, daß die Freisetzung von Cytochrom c ein Schlüsselereignis im Apoptosegeschehen darstellen könnte. Damit stellt die Cytochrom c-Freisetzung einen möglichen Angriffspunkt antiapoptotischer Substanzen dar. Die in dieser Arbeit beobachtete Expressionssteigerung von Bcl-x<sub>L</sub> durch Dexamethason könnte zu einer verminderten Cytochrom c-Freisetzung und damit zu einer Hemmung der Apoptose beitragen (Gross *et al.*, 1999; Shimizu *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Cytochrom c-Freisetzung bei der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose in FTO-2B-Zellen eine Rolle spielt. Dazu wurde nach schonendem Zellaufschluß per differentieller Zentrifugation eine Mitochondrien-haltige Fraktion von der des Cytosols abgetrennt und in beiden der Gehalt des Cytochrom c im Western-Blot bestimmt. Als Positivkontrolle wurde die Thymocytelinie Jurkat J16 mit Staurosporin behandelt: Von diesem System war bekannt, daß es unter Staurosporin-induzierter Apoptose eine Freisetzung des Cytochrom c ins Cytosol zeigt (z.B. Bossy-Wetzel *et al.*, 1998).

In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich in Jurkat-T-Zellen eine starke Cytochrom c-Relokalisation, die sich bereits 2 h nach Beginn der Staurosporin-Inkubation andeutete. Bereits nach 4 h lag ein großer Teil des Cytochrom c im Cytosol vor, und diese Umverteilung setzte sich mit zunehmender Behandlungszeit fort. Anders dagegen in FTO-2B-Zellen. Hier wurde keine deutliche Verschiebung der Cytochrom c-Lokalisation beobachtet. Zwar war in allen TGF- $\beta$ -behandelten Proben eine leichte Cytochrom c-Freisetzung festzustellen, die allerdings im Vergleich zu der in Jurkat-T-Zellen beobachteten sehr gering ausfiel und sich zudem im Laufe der TGF- $\beta$ -Behandlung nicht verstärkte.

Die Ergebnisse zur Cytochrom c-Relokalisation in Jurkat T-Zellen entsprechen dem, was aus der Literatur bekannt ist (z.B. Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Schwieriger zu interpretieren sind die Ergebnisse in FTO-2B-Zellen.

Prinzipiell könnte bereits eine geringe Anreicherung von Cytochrom c im Cytosol ausreichen, um Apoptose zu induzieren, weil die dadurch ausgelöste Prozessierung der Pro-Caspase-9 die Proteasekaskade der Caspasen in Gang setzen könnte, die keiner weiteren Cytochrom c-Freisetzung bedarf (Li, P. *et al.*, 1997). Allerdings gibt es vermutlich eine Konzentrationsschwelle, unterhalb der cytosolisches Cytochrom c nicht zur Aktivierung der Caspasekaskade führt. So könnte Bcl-x<sub>L</sub> kleinere Mengen des Cytochrom c kompetieren, da es selbst an Apaf-1 bindet und dadurch möglicherweise die Aktivierung der Pro-Caspase-9 zu hemmen vermag (Pan *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998), so wie CED-9 an CED-4 bindet und dadurch die CED-3-Aktivierung hemmt (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Chaudhary *et al.*, 1998). Weiterhin hemmen Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> die Caspase-abhängige Induktion von Apoptose durch Mikroinjektion von Cytochrom c (Li, F. *et al.*, 1997; Brustugun *et al.*, 1998), evtl. weil zumindest Bcl-x<sub>L</sub> Cytochrom c bindet (Kharbanda *et al.*, 1997). Schließlich kann die Proteinklasse der IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) eine gewisse Menge aktivierter Caspasen hemmen (LaCasse *et al.*, 1998) und so zur Bildung eines Grenzwertes der Caspase-Aktivierung führen, unterhalb dessen es zu keiner Aktivierung der gesamten Caspasekaskade kommt.

Da FTO-2B-Zellen im Laufe der TGF- $\beta$ -Inkubation erst nach und nach apoptotische Zeichen wie das Ablösen von der Unterlage, Caspase-3-Aktivierung, DNA-Abbau und DNA-Fragmentierung zeigten, wäre eigentlich zu erwarten gewesen, daß dies auch für die Relokalisation des Cytochrom c zutreffen würde, wenn dieser Prozeß am Apoptosegeschehen beteiligt wäre. Daß dies nicht beobachtet wurde, läßt eine funktionelle Bedeutung der beobachteten Cytochrom c-Freisetzung zweifelhaft erscheinen. Dieser Zweifel scheint nicht unbegründet, da Tang *et al.* (1998b) zeigten, daß eine Apoptose-assoziierte Cytochrom c-Freisetzung vom Apoptosestimulus und vom betrachteten, biologischen System abhängen.

Die einfachste, daher vielleicht auch beste Erklärung für die beobachtete geringfügige Cytochrom c-Freisetzung ist die, daß sich TGF- $\beta$ -behandelte Zellen fester als unbehandelte Zellen an den Untergrund anheften. So mußten TGF- $\beta$ -behandelte FTO-2B-Zellen länger mit Trypsin/EDTA behandelt werden, um sie von der Unterlage abzulösen und häufiger durch Kanülen gezogen werden, um sie für eine Cytofluorometer-Messung zu vereinzeln. Vermutlich wurden aus diesem Grund mehr Zellen und Mitochondrien geschädigt als bei der Aufarbeitung un behandelter Zellen.

Deshalb wurde aus den Ergebnissen zur Umverteilung von Cytochrom c geschlossen, daß dieser Prozeß bei der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose der FTO-2B-Zellen keine wesentliche Rolle spielte. Die Cytochrom c-Freisetzung war daher für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Apoptoseinhibition uninteressant.

### **5.7 Zusammenfassung**

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Aufgabe, einen eventuell existierenden, universellen Angriffspunkt der antiapoptotischen Wirkung von Tumorpromotoren und anderen Substanzen zu finden.

Apoptose und Zellteilung stehen in der Gewebshomöostase in einem empfindlichen Gleichgewicht. Eine Störung dieses Gleichgewichts ist als Ursache einer Vielzahl pathologischer Erscheinungen erkannt worden, so auch bei Krebs.

Die Hemmung der Apoptose genetisch veränderter Zellen durch tumorpromovierende Substanzen trägt zu deren Proliferation und letztlich zur Kanzerogenese bei.

In dieser Arbeit wurden die beiden bekannten Tumorpromotoren Phenobarbital und Dieldrin untersucht. Daneben wurden die Hormone Dexamethason und Insulin als Vertreter antiapoptotisch aktiver Substanzen, von denen kein tumorpromovierender Effekt bekannt war, in die Untersuchung aufgenommen.

Als biologisches Modell zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der antiapoptotischen Effekte dieser Substanzen wurde die TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose von FTO-2B-Rattenhepatomzellen gewählt, da TGF- $\beta$  als Tumorsuppressor in hepatischen Systemen gilt und daher auch in physiologischer Hinsicht einen Gegenspieler der Tumorpromotoren darstellt.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Alle vier untersuchten Substanzen zeigten eine antiapoptotische Wirkung.

Diese Wirkung kann nicht auf eine Synchronisierung der Zellen zurückgeführt werden, da alle Verbindungen nur einen geringfügigen Einfluß auf die Zellzyklusverteilung ausübten.

Bis auf Insulin war keine der getesteten Verbindungen in der Lage, die TGF- $\beta$ -spezifische, Smad-Protein-vermittelte, transkriptionelle Aktivierung eines Reportergenkonstrukts zu inhibieren. Zumindest für die drei anderen Substanzen gilt deshalb, daß ihr Eingriff in den apoptotischen TGF- $\beta$ -Signalweg vermutlich erst im Anschluß an die transkriptionelle Smad-Aktivität erfolgt.

Mit Ausnahme von Insulin führte keine der untersuchten Verbindungen zu einer Aktivierung der Proteinkinasen ERK1 und -2, JNK und Akt/PKB. Die Insulin-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 könnte die bei dieser Verbindung beobachtete Hemmung der Smad-vermittelten Transkription erklären, die Aktivierung von Akt/PKB dessen antiapoptotische Wirkung.

Einzig Dexamethason bewirkte eine gesteigerte Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins Bcl-x<sub>L</sub>, was seine Apoptose-suppressive Wirkung erklären könnte. Die Expression des proapoptotischen Bax-Proteins wurde von keiner Substanz beeinflusst.

Der Mechanismus der antiapoptotischen Aktivität von Phenobarbital und Dieldrin ist ungeklärt, jedoch scheint ein Schutz vor Apoptose-assoziiierter Mitochondrienschädigung nicht entscheidend zu sein, da TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose in FTO-2B-Zellen nicht mit einer Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien einhergeht.

Sollten Tumorpromotoren und andere antiapoptotisch wirksame Substanzen einen universellen Angriffspunkt im Apoptosegeschehen aufweisen, so liegt dieser vermutlich spät im apoptotischen TGF- $\beta$ -Signalweg.



## 6 Anhang

### 6.1 Versuchsdaten und Statistik

#### 6.1.1 Die antiapoptotische Aktivität von Dexamethason, Insulin, Phenobarbital und Dieldrin

**Tabelle 1: Daten der Ergebnisse der Apoptose-Untersuchung.** Die Daten wurden normiert, indem für jeden Versuch der Anteil der subdiploiden Kerne der TGF- $\beta$ -behandelten Probe (-/TGF- $\beta$ ) gleich 100 % gesetzt wurde und der Anteil der subdiploiden Kerne der anderen Zellbehandlungen als Bruchteil des Anteils der subdiploiden Kerne der TGF- $\beta$ -behandelten Probe ausgedrückt wurde. Abkürzungen: Dexa: Dexamethason; PB: Phenobarbital; Std.abw.: Standardabweichung.

Behandlung	Anteil subdiploider Kerne in Prozent der TGF- $\beta$ -behandelten Probe						Mittelwert	Std.abw.
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5			
- / -	14,4	24,5	7,6	5,4	10,2	<b>12,4</b>	7,5	
- / TGF- $\beta$	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	<b>100,0</b>	0,0	
Dexa / -	8,9	22,4	12,2	-	-	<b>14,5</b>	7,1	
Dexa / TGF- $\beta$	21,2	27,2	14,5	-	-	<b>20,9</b>	6,4	
Insulin / -	10,3	17,3	14,6	-	-	<b>14,1</b>	3,5	
Insulin / TGF- $\beta$	74,8	57,5	34,3	-	-	<b>55,5</b>	20,3	
PB / -	14,8	47,4	24,3	-	-	<b>28,8</b>	16,8	
PB / TGF- $\beta$	30,0	55,1	14,1	-	-	<b>33,1</b>	20,7	
Dieldrin / -	13,3	18,0	11,2	-	-	<b>14,1</b>	3,5	
Dieldrin / TGF- $\beta$	62,4	55,7	46,5	-	-	<b>54,9</b>	8,0	

**Tabelle 2: Statistische Analyse der Daten in Tabelle 1.** Geprüft wurde, ob der Anteil subdiploider Kerne einer Probe A: niedriger ist als die der TGF- $\beta$ -behandelten Probe (-/TGF- $\beta$ ; Spalte 2), B: höher ist als die der unbehandelten Kontrollprobe (-/-; Spalte 3) und C: ob der Anteil subdiploider Kerne einer TGF- $\beta$ -behandelten Probe (x/TGF- $\beta$ ) höher ist als der der korrespondierenden Probe ohne TGF- $\beta$  (x/-; Spalte 3). Ein Students-t-Test wurde für unabhängige Proben unterschiedlicher Varianz mit einer Endfläche durchgeführt. Das Ergebnis, der p-Wert, gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit der geprüften Hypothese an. Kursiv und fett gesetzt wurden statistisch signifikante Ergebnisse mit  $p < 0.05$ . Abkürzungen: Dexa: Dexamethason; PB: Phenobarbital.

Behandlung	p-Wert		
	niedriger als - / TGF- $\beta$	höher als -/-	+/- höher als +/-
- / -	<i><b>0,00001</b></i>	-	-
- / TGF- $\beta$	-	<i><b>0,00001</b></i>	<i><b>0,00001</b></i>
Dexa / -	<i><b>0,0011</b></i>	0,3558	-
Dexa / TGF- $\beta$	<i><b>0,0011</b></i>	0,0738	0,1531
Insulin / -	<i><b>0,0003</b></i>	0,3453	-
Insulin / TGF- $\beta$	<i><b>0,0315</b></i>	<i><b>0,0284</b></i>	<i><b>0,0337</b></i>
PB / -	<i><b>0,0090</b></i>	0,1125	-
PB / TGF- $\beta$	<i><b>0,0152</b></i>	0,1102	0,3986
Dieldrin / -	<i><b>0,0003</b></i>	0,3369	-
Dieldrin / TGF- $\beta$	<i><b>0,0052</b></i>	<i><b>0,0008</b></i>	<i><b>0,0027</b></i>

### 6.1.2 Der antimitogene Effekt von TGF- $\beta$ und dessen Modulation durch Apoptoseinhibitoren

**Tabelle 3: Daten der Ergebnisse der Zellzyklus-Untersuchung an FTO-2B-Zellen.** Zu den Ergebnissen der Einzelversuche wurden Mittelwert und Standardabweichung (Std.Abw.) berechnet.

Behandlung		Anteil der Zellzyklusphase [%]		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase	S-Phase	G <sub>2</sub> /M-Phase
<b>Kontrolle</b>	Versuch 1	45,1	45,7	9,2
	Versuch 2	46,8	41,7	11,5
	Versuch 3	44,1	43,4	12,5
	Versuch 4	43,9	42,6	13,5
	Versuch 5	49,0	37,8	13,2
	<b>Mittelwert</b>	<b>45,8</b>	<b>42,2</b>	<b>12,0</b>
	Std.abw.	2,1	2,9	1,7
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Versuch 1	60,0	27,9	12,1
	Versuch 2	48,1	41,3	10,6
	Versuch 3	60,9	28,9	10,2
	Versuch 4	61,6	28,1	10,3
	Versuch 5	58,8	30,3	10,9
	<b>Mittelwert</b>	<b>57,9</b>	<b>31,3</b>	<b>10,8</b>
	Std.abw.	5,6	5,7	0,8
<b>Dexamethason</b>	Versuch 1	59,1	31,9	9,0
	Versuch 2	53,1	37,2	9,8
	Versuch 3	56,9	32,3	10,9
	<b>Mittelwert</b>	<b>56,3</b>	<b>33,8</b>	<b>9,9</b>
	Std.abw.	3,1	2,9	0,9
<b>Insulin</b>	Versuch 1	47,4	39,1	13,5
	Versuch 2	44,9	42,7	12,4
	Versuch 3	45,1	42,1	12,9
	<b>Mittelwert</b>	<b>45,8</b>	<b>41,3</b>	<b>12,9</b>
	Std.abw.	1,4	1,9	0,6
<b>Phenobarbital</b>	Versuch 1	46,7	40,1	13,1
	Versuch 2	45,7	37,5	16,8
	Versuch 3	45,5	40,5	14,0
	<b>Mittelwert</b>	<b>46,0</b>	<b>39,4</b>	<b>14,6</b>
	Std.abw.	0,7	1,6	1,9
<b>Dieldrin</b>	Versuch 1	42,7	39,3	18,0
	Versuch 2	39,9	42,0	18,1
	Versuch 3	43,5	33,4	23,1
	<b>Mittelwert</b>	<b>42,1</b>	<b>38,2</b>	<b>19,7</b>
	Std.abw.	1,9	4,4	2,9

Fortsetzung von Tabelle 3:

Behandlung		Anteil der Zellzyklusphase [%]		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase	S-Phase	G <sub>2</sub> /M-Phase
<b>Dexamethason/TGF-β</b>	Versuch 1	69,7	19,7	10,6
	Versuch 2	60,8	28,8	10,4
	Versuch 3	65,0	23,0	12,0
	<b>Mittelwert</b>	<b>65,2</b>	<b>23,8</b>	<b>11,0</b>
	Std.abw.	4,5	4,6	0,9
<b>Insulin/TGF-β</b>	Versuch 1	62,8	25,4	11,9
	Versuch 2	48,2	41,7	10,1
	Versuch 3	56,2	33,3	10,6
	<b>Mittelwert</b>	<b>55,7</b>	<b>33,5</b>	<b>10,8</b>
	Std.abw.	7,3	8,2	0,9
<b>Phenobarbital/TGF-β</b>	Versuch 1	52,0	35,6	12,4
	Versuch 2	48,8	32,4	18,8
	Versuch 3	58,9	27,0	14,1
	<b>Mittelwert</b>	<b>53,3</b>	<b>31,6</b>	<b>15,1</b>
	Std.abw.	5,2	4,4	3,3
<b>Dieldrin/TGF-β</b>	Versuch 1	45,6	39,8	14,6
	Versuch 2	41,5	38,2	20,3
	Versuch 3	46,0	38,3	15,6
	<b>Mittelwert</b>	<b>44,4</b>	<b>38,8</b>	<b>16,9</b>
	Std.abw.	2,5	0,9	3,0

**Tabelle 4: Statistische Signifikanz der Veränderungen der Zellzyklusverteilung von FTO-2B-Zellen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.** Geprüft wurde, ob sich der Anteil der jeweiligen Zellzyklusphase von FTO-2B-Zellen durch die angegebene Behandlung von dem der unbehandelten Kontrollprobe unterschied (siehe Tabelle 3). Der t-Test wurde für unabhängige Proben unterschiedlicher Varianz mit zwei Endflächen durchgeführt. Das Ergebnis, der p-Wert, gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit der geprüften Hypothese an. Kursiv und fett gesetzt wurden statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0.05$ ).

Behandlung	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase	S-Phase	G <sub>2</sub> /M-Phase
TGF-β	<i><b>0,006</b></i>	<i><b>0,009</b></i>	0,218
Dexamethason	<i><b>0,011</b></i>	<i><b>0,015</b></i>	0,067
Insulin	0,984	0,593	0,317
Phenobarbital	0,854	0,122	0,123
Dieldrin	0,052	0,251	<i><b>0,027</b></i>

**Tabelle 5: Statistische Signifikanz der Veränderungen der Zellzyklusverteilung von FTO-2B-Zellen gegenüber nur mit TGF- $\beta$ -behandelten Zellen.** Geprüft wurde, ob sich der Anteil der jeweiligen Zellzyklusphase durch die angegebene Behandlung von dem der nur mit TGF- $\beta$ -behandelten Zellen unterschied (siehe Tabelle 3). Der t-Test wurde für unabhängige Proben unterschiedlicher Varianz mit zwei Endflächen durchgeführt. Das Ergebnis, der p-Wert, gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit der geprüften Hypothese an. Kursiv und fett gesetzt wurden statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0.05$ ).

Behandlung	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase	S-Phase	G <sub>2</sub> /M-Phase
Dexamethason/TGF- $\beta$	0,096	0,096	0,768
Insulin/TGF- $\beta$	0,681	0,712	0,966
Phenobarbital/TGF- $\beta$	0,290	0,926	0,152
Dieldrin/TGF- $\beta$	<b>0,004</b>	<b>0,040</b>	0,069

**Tabelle 6: Daten der Ergebnisse der Zellzyklus-Untersuchung an HepG2-Zellen.** Zu den Ergebnissen der Einzelversuche wurden Mittelwert und Standardabweichung (Std.Abw.) berechnet. Geprüft wurde, ob sich der Anteil der jeweiligen Zellzyklusphase durch TGF- $\beta$ -Behandlung von dem der unbehandelten Kontrollzellen unterschied. Der t-Test wurde für unabhängige Proben unterschiedlicher Varianz mit zwei Endflächen durchgeführt. Das Ergebnis, der p-Wert, gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit der geprüften Hypothese an. Kursiv und fett gesetzt wurden statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0.05$ ).

Behandlung		Anteil der Zellzyklusphase [%]		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase	S-Phase	G <sub>2</sub> /M-Phase
<b>Kontrolle</b>	Versuch 1	51,5	22,9	25,6
	Versuch 2	53,3	15,1	31,6
	Versuch 3	58,1	29,8	12,1
	Versuch 4	61,2	25,6	13,2
	Versuch 5	57,2	25,9	16,9
	<b>Mittelwert</b>	<b>56,3</b>	<b>23,9</b>	<b>19,9</b>
	Std.abw.	3,9	5,5	8,4
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Versuch 1	54,0	26,1	19,9
	Versuch 2	52,6	20,5	26,9
	Versuch 3	53,5	30,3	16,2
	Versuch 4	64,2	22,3	13,4
	Versuch 5	64,0	18,1	17,9
	<b>Mittelwert</b>	<b>57,7</b>	<b>23,5</b>	<b>18,9</b>
	Std.abw.	5,9	4,8	5,1
<b>t-Test</b>	<b>p-Wert</b>	0,672	0,910	0,825

### 6.1.3 Der Einfluß von Apoptoseinhibitoren auf den Smad-Signalweg

**Tabelle 7: Daten der Ergebnisse der Reporter-Untersuchung zur Induktion des Smad-Signalweges durch TGF- $\beta$  an FTO-2B- und HepG2-Zellen.** Zu den Ergebnissen der Einzelversuche wurden Mittelwert und Standardabweichung (Std.Abw.) berechnet. Die statistische Signifikanz der Abweichung der TGF- $\beta$ -Induktion vom Wert 1 wurde mittels eines Student-t-Tests (zwei Endflächen, unterschiedliche Varianz) bestimmt.

	FTO-2B			HepG2		
	relative Reporter- genaktivität		Induktion [x-fach]	relative Reporter- genaktivität		Induktion [x-fach]
	Kontrolle	TGF- $\beta$		Kontrolle	TGF- $\beta$	
Versuch 1	56	132	2,39	104	318	3,05
Versuch 2	50	118	2,38	108	316	2,92
Versuch 3	110	232	2,10	171	599	3,50
Versuch 4	94	179	1,91	-	-	-
Versuch 5	99	217	2,20	-	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>82</b>	<b>176</b>	<b>2,20</b>	<b>128</b>	<b>411</b>	<b>3,16</b>
Std.abw.	27	50	0,20	38	163	0,30
<b>t-Test</b>			<b>p=0,0002</b>			<b>p=0,0065</b>

**Tabelle 8: Daten der Ergebnisse der Reporter-Untersuchung zur Interferenz antiapoptotischer Substanzen mit der TGF- $\beta$ -abhängigen Aktivierung des Smad-Signalweges an FTO-2B-Zellen.** Der Interferenzfaktor ergab sich als Verhältnis der relativen Reporter-Genaktivität mit Apoptoseinhibitor zu der des Wertes ohne Apoptoseinhibitor. Zu den Ergebnissen der Einzelversuche wurden Mittelwert und Standardabweichung (Std.Abw.) berechnet. Die statistische Signifikanz der Abweichung des Interferenzfaktors vom Wert 1 wurde mittels eines Student-t-Tests (zwei Endflächen, unterschiedliche Varianz) bestimmt. Kursiv und fett gesetzt sind p-Werte, die statistische Relevanz anzeigen ( $p < 0,05$ ).

Apoptoseinhibitor		relative Reporter-Genaktivität		Interferenz- faktor	statistische Auswertung
		ohne Apoptoseinhibitor	mit Apoptoseinhibitor		
<b>Dexamethason</b>	Versuch 1	149	180	1,20	Mittelwert 1,14
	Versuch 2	251	271	1,08	Std.abw. 0,06
	Versuch 3	241	277	1,15	t-Test <b>p=0,055</b>
<b>Insulin</b>	Versuch 1	132	78	0,59	Mittelwert 0,47
	Versuch 2	223	108	0,48	Std.abw. 0,13
	Versuch 3	226	75	0,33	t-Test <b>p=0,019</b>
<b>Phenobarbital</b>	Versuch 1	115	130	1,13	Mittelwert 1,22
	Versuch 2	223	297	1,33	Std.abw. 0,10
	Versuch 3	188	223	1,18	t-Test <b>p=0,070</b>
<b>Dieldrin</b>	Versuch 1	203	199	0,98	Mittelwert 1,26
	Versuch 2	146	210	1,44	Std.abw. 0,25
	Versuch 3	183	250	1,37	t-Test <b>p=0,210</b>

### 6.1.4 Die Bedeutung der Cytochrom c-Freisetzung in der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose

**Tabelle 9: Auswertung der Signalstärken der Cytochrom c-Banden von Abbildung 4-14.** Die Quantifizierung der Bandenstärke erfolgte wie in Kap. 3.5.7 beschrieben. Das relative Signalverhältnis ergab sich wie folgt: Zunächst wurde das Verhältnis des Chemilumineszenzsignals der Cytosolfraktion zu dem der Mitochondrienfraktion bestimmt (Signalverhältnis). Dieser Wert wurde dann in Relation zu dem der unbehandelten Probe nach 2 h (Jurkat J16) bzw. nach 16 h (FTO-2B) gesetzt (relatives Signalverhältnis). Die statistische Signifikanz der Abweichung dieses Wertes der TGF- $\beta$ -behandelten FTO-2B-Zellen von denen der Kontrollproben wurde mittels eines Student-t-Tests (zwei Endflächen, unterschiedliche Varianz, unabhängige Proben) bestimmt.

Zelllinie	Behandlung	Inkubation [h]	Chemilumineszenzsignal		relatives Signalverhältnis
			Cytosol	Mitochondrium	
Jurkat J16	Kontrolle	2	26290	122520	1,0
		4	5287	98742	0,2
	Staurosporin	2	34383	97927	1,6
		4	87015	22538	18,0
		6	145434	9615	70,5
FTO-2B	Kontrolle	16	60894	232230	1,0
		24	30607	159182	0,7
	TGF- $\beta$	4	138657	121083	4,4
		8	59471	187263	1,2
		12	71571	97218	2,8
		16	83495	123062	2,6
		24	138618	158585	3,3
				Mittelwert:	2,9
				Standardabw.:	1,2
			t-Test	p-Wert:	<b>0.033</b>

## 6.2 Literaturverzeichnis

- Adachi, S., Cross, A. R., Babior, B. M. und Gottlieb, R. A. (1997). Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 272, 21878-82.
- Adams, J. M. und Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-6.
- Adler, V., Franklin, C. C. und Kraft, A. S. (1992). Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: regulation by the N-terminal delta domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5341-5.
- Afrakhte, M., Moren, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermark, B., Heldin, C.-H., Heldin, N. E. und ten Dijke, P. (1998). Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- $\beta$  family members. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 505-11.
- Ahmed, N. N., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Chan, T. O. und Tsichlis, P. N. (1997). Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3627-32.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. und Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 15, 6541-51.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A. und Bownes, M. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776-89.
- Alevizopoulos, A. und Mermod, N. (1997). Transforming growth factor- $\beta$ : the breaking open of a black box. *Bioessays* 19, 581-91.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. und Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Alpert, D., Schwenger, P., Han, J. und Vilcek, J. (1999). Cell stress and MKK6b-mediated p38 MAP kinase activation inhibit tumor necrosis factor-induced I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 274, 22176-83.
- Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D. M., Martin, S. J., Cotter, T. G., Salvesen, G. S. und Green, D. R. (1998). Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ* 5, 298-306.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.-J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. und Martinou, J. C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-2.
- Aravind, L., Dixit, V. M. und Koonin, E. V. (1999). The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 24, 47-53.
- Ashkenazi, A. und Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-8.

Atfi, A., Buisine, M., Mazars, A. und Gespach, C. (1997). Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor- $\beta$  through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem* 272, 24731-4.

Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182, 31-48.

Bansal, N., Houle, A. und Melnykovych, G. (1991). Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *Faseb J* 5, 211-6.

Bariat, I., Henglein, B., Plet, A., Lamb, N., Fernandez, A., McKenzie, F., Pouyssegur, J., Vie, A. und Blanchard, J. M. (1995). TGF- $\beta$  1 and cAMP attenuate cyclin A gene transcription via a cAMP responsive element through independent pathways. *Oncogene* 11, 1309-18.

Baserga, R. (1994). Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79, 927-30.

Bates, W. K. und McAllister, D. F. (1974). Some methods for nonlinear regression using desk-top calculators with an application to the Lowry protein method. *Anal Biochem* 59, 190-9.

Bayly, A. C., Roberts, R. A. und Dive, C. (1994). Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J Cell Biol* 125, 197-203.

Bedossa, P., Peltier, E., Terris, B., Franco, D. und Poynard, T. (1995). Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) and TGF- $\beta$  1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 21, 760-6.

Bernardi, P., Broekemeier, K. M. und Pfeiffer, D. R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26, 509-17.

Binetruy, B., Smeal, T. und Karin, M. (1991). Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351, 122-7.

Boehm, J. E., Chaika, O. V., Lewis, R. E. (1999). Rac-dependent anti-apoptotic signaling by the insulin receptor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274, 28632-6.

Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G. und Thompson, C. B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. und Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-15.

Borner, C. und Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6, 497-507.

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D. und Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome *c* release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17, 37-49.

- Boutry, M. und Briquet, M. (1982). Mitochondrial modifications associated with the cytoplasmic male sterility in faba beans. *Eur J Biochem* 127, 129-35.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Bredesen, D. E. (1995). Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38, 839-51.
- Brunet, C. L., Gunby, R. H., Benson, R. S., Hickman, J. A., Watson, A. J. und Brady, G. (1998). Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death Differ* 5, 107-15.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. und Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-68.
- Brustugun, O. T., Fladmark, K. E., Doskeland, S. O., Orrenius, S. und Zhivotovsky, B. (1998). Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ* 5, 660-8.
- Buchmann, A., Willy, C., Buenemann, C. L., Stroh, C., Schmiechen, A. und Schwarz, M. (1999). Inhibition of transforming growth factor beta1-induced hepatoma cell apoptosis by liver tumor promoters: characterization of primary signaling events and effects on CPP32-like caspase activity. *Cell Death Differ* 6, 190-200.
- Bünemann, C. L. (1997). Nachweis von Apoptose-assoziierten Proteinen in Leberzellen. Diplomarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P. und et al. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269, 1885-8.
- Bursch, W., Lauer, B., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Schuppler, J. und Schulte-Hermann, R. (1984). Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 5, 453-8.
- Butler, W. H. und Hemsall, V. (1978). Histochemical observations on nodules induced in the mouse liver by phenobarbitone. *J Pathol* 125, 155-61.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C. und Cohen, G. M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (~700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274, 22686-92.
- Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J. und Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-413.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. und Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-21.
- Carr, B. I., Hayashi, I., Branum, E. L. und Moses, H. L. (1986). Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type  $\beta$  transforming growth factor. *Cancer Res* 46, 2330-4.

- Ceresa, B. P. und Pessin, J. E. (1998). Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Mol Cell Biochem* 182, 23-9.
- Chang, D. J., Ringold, G. M. und Heller, R. A. (1992). Cell killing and induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 188, 538-46.
- Chang, T. C., Hung, M. W., Jiang, S. Y., Chu, J. T., Chu, L. L. und Tsai, L. C. (1997). Dexamethasone suppresses apoptosis in a human gastric cancer cell line through modulation of *bcl-x* gene expression. *FEBS Lett* 415, 11-5.
- Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H. und Baltimore, D. (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-3.
- Chao, J. R., Chen, C. S., Wang, T. F., Tseng, L. H., Tsai, J. J., Kuo, M. L., Yen, J. J. und Yang-Yen, H. F. (1997). Characterization of factor-independent variants derived from TF-1 hematopoietic progenitor cells: the role of the Raf/MAP kinase pathway in the anti-apoptotic effect of GM-CSF. *Oncogene* 14, 721-8.
- Chapekar, M. S., Huggett, A. C. und Thorgeirsson, S. S. (1989). Growth modulatory effects of a liver-derived growth inhibitor, transforming growth factor  $\beta$ 1, and recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$ , in normal and neoplastic cells. *Exp Cell Res* 185, 247-57.
- Chaudhary, D., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M. und Dixit, V. M. (1998). The death inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit the CED-3 death protease. *J Biol Chem* 273, 17708-12.
- Chen, R. H., Su, Y. H., Chuang, R. L. und Chang, T. Y. (1998). Suppression of transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* 17, 1959-68.
- Cheng, E. H.-Y., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K. und Hardwick, J. M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-8.
- Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Fujita, H., Yoshida, M., Chen, W., Asai, A., Himeno, M., Yokoyama, S. und Kuchino, Y. (1999). Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 18, 2281-90.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R. und Dixit, V. M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-6.
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. und Lutz, R. J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14, 5589-96.
- Choy, L. und Derynck, R. (1998). The type II transforming growth factor (TGF)- $\beta$  receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF- $\beta$  response. *J Biol Chem* 273, 31455-62.
- Chuang, L. Y., Hung, W. C., Chang, C. C. und Tsai, J. H. (1994). Characterization of apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta$  1 in human hepatoma cells. *Anticancer Res* 14, 147-52.

- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol Berl* 181, 195-213.
- Cleary, M. L., Smith, S. D. und Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19-28.
- Clem, R. J., Cheng, E. H.-Y., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A. und Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-X<sub>L</sub> through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 554-9.
- Corcoran, G. B., Fix, L., Jones, D. P., Moslen, M. T., Nicotera, P., Oberhammer, F. A. und Buttyan, R. (1994). Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 128, 169-81.
- Corvera, S. und Czech, M. P. (1998). Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol* 8, 442-6.
- Cosulich, S. C., Worrall, V., Hedge, P. J., Green, S. und Clarke, P. R. (1997). Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr Biol* 7, 913-20.
- Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154, 4719-25.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-41.
- Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y. und Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor  $\beta$  induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5545-9.
- De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., Orton, T. C. und Jirtle, R. L. (1995). M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet* 11, 447-9.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. und Gauthier, J. M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF $\beta$ -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* 17, 3091-100.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-37.
- Derynck, R. (1994). TGF- $\beta$ -receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 19, 548-53.
- Derynck, R., Gelbart, W. M., Harland, R. M., Heldin, C.-H., Kern, S. E., Massagué, J., Melton, D. A., Mlodzik, M., Padgett, R. W., Roberts, A. B., Smith, J., Thomsen, G. H., Vogelstein, B. und Wang, X. F. (1996). Nomenclature: vertebrate mediators of TGF $\beta$  family signals. *Cell* 87, 173.
- Derynck, R., Zhang, Y. und Feng, X. H. (1998). Smads: transcriptional activators of TGF- $\beta$  responses. *Cell* 95, 737-40.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. und Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891-901.

Deschatrette, J. und Weiss, M. C. (1974). Characterization of differentiated and dedifferentiated clones from a rat hepatoma. *Biochimie* 56, 1603-11.

Dhanasekaran, N. und Premkumar Reddy, E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17, 1447-55.

Diaz, J. L., Oltersdorf, T., Horne, W., McConnell, M., Wilson, G., Weeks, S., Garcia, T. und Fritz, L. C. (1997). A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members. *J Biol Chem* 272, 11350-5.

Dijkmans, R. und Billiau, A. (1991). Interferon- $\gamma$ /lipopolysaccharide-treated mouse embryonic fibroblasts are killed by a glycolysis/L-arginine-dependent process accompanied by depression of mitochondrial respiration. *Eur J Biochem* 202, 151-9.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. und Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-5.

Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. und Greenberg, M. E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-5.

Eguchi, Y., Shimizu, S. und Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835-40.

Elion, E. A. (1998). Routing MAP kinase cascades. *Science* 281, 1625-6.

Ellis, H. M. und Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-29.

Ewen, M. E., Sluss, H. K., Whitehouse, L. L. und Livingston, D. M. (1993). TGF $\beta$  inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74, 1009-20.

Fan, G., Ma, X., Kren, B. T. und Steer, C. J. (1996). The retinoblastoma gene product inhibits TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis in primary rat hepatocytes and human HuH-7 hepatoma cells. *Oncogene* 12, 1909-19.

Feng, X.-H., Zhang, Y., Wu, R.-Y. und Derynck, R. (1998). The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF- $\beta$ -induced transcriptional activation. *Genes Dev* 12, 2153-63.

Fitzhugh, O. G., Nelson, A. A., Quaife, M. L. (1964). Chronic oral toxicity of aldrin and dieldrin in rats and dogs. *Fd Cosmet Tokicol* 2, 551-61.

Foo, S. Y. und Nolan, G. P. (1999). NF- $\kappa$ B to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet* 15, 229-35.

Fraser, A. und Evan, G. (1996). A license to kill. *Cell* 85, 781-4.

- Fried, J., Perez, A. G. und Clarkson, B. D. (1978). Rapid hypotonic method for flow cytofluorometry of monolayer cell cultures. Some pitfalls in staining and data analysis. *J Histochem Cytochem* 26, 921-33.
- Fukuda, K., Kojiro, M. und Chiu, J. F. (1993). Induction of apoptosis by transforming growth factor- $\beta$ 1 in the rat hepatoma cell line McA-RH7777: a possible association with tissue transglutaminase expression. *Hepatology* 18, 945-53.
- García-Ruiz, C., Colell, A., Marí, M., Morales, A. und Fernández-Checa, J. C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272, 11369-77.
- Garrigue-Antar, L., Munoz-Antonia, T., Antonia, S. J., Gesmonde, J., Vellucci, V. F., Reiss, M. (1995). Missense mutations of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 55, 3982-7.
- Geng, Y. und Weinberg, R. A. (1993). Transforming growth factor  $\beta$  effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10315-9.
- Gleizes, P.-E., Munger, J. S., Nunes, I., Harpel, J. G., Mazzieri, R., Noguera, I. und Rifkin, D. B. (1997). TGF- $\beta$  latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* 15, 190-7.
- Goldsworthy, T., Campbell, H. A. und Pitot, H. C. (1984). The natural history and dose-response characteristics of enzyme-altered foci in rat liver following phenobarbital and diethylnitrosamine administration. *Carcinogenesis* 5, 67-71.
- González-García, M., Pérez-Ballester, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L. H., Thompson, C. B. und Núñez, G. (1994). *bcl-X<sub>L</sub>* is the major *bcl-x* mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* 120, 3033-42.
- Green, D. R. und Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.
- Gressner, A. M., Lahme, B., Mannherz, H. G. und Polzar, B. (1997). TGF- $\beta$ -mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *J Hepatol* 26, 1079-92.
- Griswold-Prenner, I., Kamibayashi, C., Maruoka, E. M., Mumby, M. C. und Derynck, R. (1998). Physical and functional interactions between type I transforming growth factor  $\beta$  receptors and  $B\alpha$ , a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* 18, 6595-604.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. und Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17, 3878-85.
- Gross, A., Yin, X.-M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Korsmeyer, S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-X<sub>L</sub> prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274, 1156-63.
- Gu, Y., Wu, J., Fauche, C., Lalanne, J.-L., Diu, A., Livingston, D. J. und Su, M. S.-S. (1995). Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms *in vivo*. *Embo J* 14, 1923-31.

Guo, D. und Donner, D. B. (1996). Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of IRS-1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 271, 615-8.

Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T. M. S., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H. und Kern, S. E. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271, 350-3.

Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E., Longthorne, V. L., Culhane, A. C. und Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236, 1-26.

Halestrap, A. P. (1989). The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria *in vivo* and *in vitro* and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta* 973, 355-82.

Hannon, G. J. und Beach, D. (1994). p15<sup>ink4b</sup> is a potential effector of Tgf- $\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-61.

Harmon, J. M., Norman, M. R., Fowlkes, B. J. und Thompson, E. B. (1979). Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. *J Cell Physiol* 98, 267-78.

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Jr., Wrana, J. L. und Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF $\beta$  receptor and functions as an antagonist of TGF $\beta$  signaling. *Cell* 89, 1165-73.

Hengartner, M. O., Ellis, R. E. und Horvitz, H. R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-9.

Hengartner, M. O. (1997). Apoptosis. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 388, 714-5.

Hepburn, A., Boeynaems, J.-M., Fiers, W. und Dumont, J. E. (1987). Modulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  cytotoxicity in L929 cells by bacterial toxins, hydrocortisone and inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 149, 815-22.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7, 2135-48.

Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. und Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573-81.

Holinger, E. P., Chittenden, T. und Lutz, R. J. (1999). Bak BH3 peptides antagonize Bcl-X<sub>L</sub> function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem* 274, 13298-304.

Hsu, Y.-T., Wolter, K. G. und Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X<sub>L</sub> during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3668-72.

- Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. und Núñez, G. (1998). Bcl-X<sub>L</sub> interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-91.
- Hua, X., Liu, X., Ansari, D. O. und Lodish, H. F. (1998). Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF- $\beta$ -induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes Dev* 12, 3084-95.
- Huang, Y. L. und Chou, C. K. (1998). Bcl-2 blocks apoptotic signal of transforming growth factor- $\beta$  in human hepatoma cells. *J Biomed Sci* 5, 185-91.
- Ichas, F., Jouaville, L. S. und Mazat, J. P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89, 1145-53.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. und Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF- $\beta$  superfamily. *Nature* 389, 622-6.
- Inagaki, M., Moustakas, A., Lin, H. Y., Lodish, H. F. und Carr, B. I. (1993). Growth inhibition by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) type I is restored in TGF- $\beta$ -resistant hepatoma cells after expression of TGF- $\beta$  receptor type II cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5359-63.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-8.
- Ip, Y. T. und Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-19.
- Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. und Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-5.
- Ishisaki, A., Yamato, K., Nakao, A., Nonaka, K., Ohguchi, M., ten Dijke, P. und Nishihara, T. (1998). Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem* 273, 24293-6.
- Ito, N., Tsuda, H., Hasegawa, R. und Imaida, K. (1983). Comparison of the promoting effects of various agents in induction of preneoplastic lesions in rat liver. *Environ Health Perspect* 50, 131-8.
- Jacobson, M. D. und Raff, M. C. (1995). Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374, 814-6.
- Janknecht, R., Wells, N. J. und Hunter, T. (1998). TGF- $\beta$ -stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev* 12, 2114-9.
- Jirtle, R. L., Hankins, G. R., Reisenbichler, H. und Boyer, I. J. (1994). Regulation of mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptors and transforming growth factor beta during liver tumor promotion with phenobarbital. *Carcinogenesis* 15, 1473-8.
- Jonk, L. J., Itoh, S., Heldin, C.-H., ten Dijke, P. und Kruijer, W. (1998). Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor- $\beta$ , activin und bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 273, 21145-52.

Jürgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. und Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.

Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. und Evan, G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544-8.

Kennedy, S. G., Wagner, A. J., Conzen, S. D., Jordán, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P. N. und Hay, N. (1997). The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 11, 701-13.

Kerchhoff, E. und Rapp, U. R. (1998). Cell Cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* 17, 1457-62.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.

Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z. M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C. und Kufe, D. (1997). Role for Bcl-x<sub>L</sub> as an inhibitor of cytosolic cytochrome c accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6939-42.

Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennström, S., Warne, P. H. und Downward, J. (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J* 16, 2783-93.

Khwaja, A. (1999). Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 401, 33-4.

Killary, A. M. und Fournier, R. E. (1984). A genetic analysis of extinction: trans-dominant loci regulate expression of liver-specific traits in hepatoma hybrid cells. *Cell* 38, 523-34.

Kim, C. N., Wang, X., Huang, Y., Ibrado, A. M., Liu, L., Fang, G. und Bhalla, K. (1997). Overexpression of Bcl-x<sub>L</sub> inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 57, 3115-20.

Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K. und Miyajima, A. (1995a). Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. *Embo J* 14, 266-75.

Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K. und Miyajima, A. (1995b). Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* 10, 2207-12.

Kirsch, D. G., Doseff, A., Chau, B. N., Lim, D.-S., de Souza-Pinto, N. C., Hansford, R., Kastan, M. B., Lazebnik, Y. A. und Hardwick, J. M. (1999). Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 274, 21155-61.

Kiss, A., Wang, N.-J., Xie, J. P. und Thorgeirsson, S. S. (1997). Analysis of transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ /epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth factor/c-met, TGF- $\beta$  receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 3, 1059-66.

Kitagawa, T., Hirakawa, T., Ishikawa, T., Nemoto, N. und Takayama, S. (1980). Induction of hepatocellular carcinoma in rat liver by initial treatment with benzo(a)pyrene after partial hepatectomy and promotion by phenobarbital. *Toxicol Lett* 6, 167-71.

- Kitanaka, C. und Kuchino, Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 6, 508-15.
- Klaunig, J. E. (1993). Selective induction of DNA synthesis in mouse preneoplastic and neoplastic hepatic lesions after exposure to phenobarbital. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 5, 235-9.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R. und Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-6.
- Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A. und Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-9.
- Kolaja, K. L., Stevenson, D. E., Walborg, E. F., Jr. und Klaunig, J. E. (1996a). Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis. *Carcinogenesis* 17, 947-54.
- Kolaja, K. L., Stevenson, D. E., Walborg, E. F., Jr. und Klaunig, J. E. (1996b). Selective dieldrin promotion of hepatic focal lesions in mice. *Carcinogenesis* 17, 1243-50.
- Konishi, H., Kuroda, S., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T. und Kikkawa, U. (1995). Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and  $\beta\gamma$  subunits of G proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 526-34.
- Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L. und Burgering, B. M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-4.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S. und Nunez, G. (1998). ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5156-60.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. und Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-14.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H. G. und Reed, J. C. (1994a). Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 145, 1323-36.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H. G., Irie, S., Fong, L. und Reed, J. C. (1994b). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 54, 5501-7.
- Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. und Massagué, J. (1999). A mechanism of repression of TGF $\beta$ /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13, 804-16.
- Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3, 614-20.

Kulik, G., Klippel, A. und Weber, M. J. (1997). Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 17, 1595-606.

Kumar, S. und Colussi, P. A. (1999). Prodomains - adaptors - oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24, 1-4.

Kuwana, T., Smith, J. J., Muzio, M., Dixit, V., Newmeyer, D. D. und Kornbluth, S. (1998). Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273, 16589-94.

Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. und Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-60.

Labbé, E., Silvestri, C., Hoodless, P. A., Wrana, J. L. und Attisano, L. (1998). Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF $\beta$ -dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* 2, 109-20.

LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G. und MacKenzie, A. E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-59.

Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. und Massagué, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- $\beta$  signalling pathways. *Nature* 383, 832-6.

Laiho, M., DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M. und Massagué, J. (1990). Growth inhibition by TGF- $\beta$  linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62, 175-85.

Laiho, M., Rönstrand, L., Heino, J., Decaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M. und Massagué, J. (1991). Control of junB and extracellular matrix protein expression by transforming growth factor- $\beta$ 1 is independent of simian virus 40 T antigen-sensitive growth-sensitive growth-inhibitory events. *Mol Cell Biol* 11, 972-8.

Leverrier, Y., Thomas, J., Perkins, G. R., Mangeney, M., Collins, M. K. und Marvel, J. (1997). In bone marrow derived Baf-3 cells, inhibition of apoptosis by IL-3 is mediated by two independent pathways. *Oncogene* 14, 425-30.

Li, J., Billiar, T. R., Talanian, R. V. und Kim, Y. M. (1997). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 419-24.

Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J. und Fritz, L. C. (1997). Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-x<sub>L</sub> has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem* 272, 30299-305.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. und Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. und Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Lin, J. K. und Chou, C. K. (1992). In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor  $\beta$ <sub>1</sub>. *Cancer Res* 52, 385-8.

- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. und Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-57.
- Lucier, G. W., Tritscher, A., Goldsworthy, T., Foley, J., Clark, G., Goldstein, J. und Maronpot, R. (1991). Ovarian hormones enhance 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated increases in cell proliferation and preneoplastic foci in a two-stage model for rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 51, 1391-7.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-90.
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L. und Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87, 1215-24.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A. und Rosen, A. (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 140, 1485-95.
- Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J. und Stamler, J. S. (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284, 651-4.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Brattain, M. und Willson J. K. V. (1995). Inactivation of the type II TGF- $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336-8.
- Marte, B. M. und Downward, J. (1997). PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 22, 355-8.
- Martinou, J. C. (1999). Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 399, 411-2.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prévost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C. und Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-31.
- Massagué, J. (1990). The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641.
- McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S. und Evan, G. I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136, 215-27.
- McMahon, J. B., Richards, W. L., del Campo, A. A., Song, M.-K. H. und Thorgeirsson, S. S. (1986). Differential effects of transforming growth factor- $\beta$  on proliferation of normal and malignant rat liver epithelial cells in culture. *Cancer Res* 46, 4665-71.
- Michalopoulos, G. K. und DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science* 276, 60-6.
- Miller, L. J., Marx, J. (1998). Apoptosis. *Science* 281, 1301.

Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. und Thompson, C. B. (1997). Bcl-x<sub>L</sub> forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-7.

Miyashita, T., Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80, 291-9.

Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. und Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-x<sub>L</sub>, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-41.

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. und 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, 817-27.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. und Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-30.

Myers, M. G., Jr., Sun, X. J. und White, M. F. (1994). The IRS-1 signaling system. *Trends Biochem Sci* 19, 289-93.

Naik, P., Karrim, J. und Hanahan, D. (1996). The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes Dev* 10, 2105-16.

Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C.-H. und ten Dijke, P. (1997). Identification of Smad7, a TGF $\beta$ -inducible antagonist of TGF- $\beta$  signalling. *Nature* 389, 631-5.

Naumovski, L. und Cleary, M. L. (1996). The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol* 16, 3884-92.

Newmeyer, D. D., Farschon, D. M. und Reed, J. C. (1994). Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79, 353-64.

Ng, F. W., Nguyen, M., Kwan, T., Branton, P. E., Nicholson, D. W., Cromlish, J. A. und Shore, G. C. (1997). p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139, 327-38.

Ng, F. W. und Shore, G. C. (1998). Bcl-x<sub>L</sub> cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor. *J Biol Chem* 273, 3140-3.

Nicholson, D. W. und Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. und Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-9.

Nishiyama, M. und Wands, J. R. (1992). Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 280-5.

- Oberhammer, F. A., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R., Purchio, A. F., Bursch, W. und Schulte-Hermann, R. (1992). Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor  $\beta$ 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5408-12.
- Ogawa, W., Matozaki, T. und Kasuga, M. (1998). Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Mol Cell Biochem* 182, 13-22.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. und Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-19.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. und Donner, D. B. (1999). NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-5.
- Palombella, V. J. und Vilcek, J. (1989). Mitogenic and cytotoxic actions of tumor necrosis factor in BALB/c 3T3 cells. Role of phospholipase activation. *J-Biol-Chem* 264, 18128-36.
- Pan, G., O'Rourke, K., und Dixit, V. M. (1998). Caspase-9, Bcl-X<sub>L</sub>, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5.
- Pap, M. und Cooper, G. M. (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273, 19929-32.
- Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W. und Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273, 7770-5.
- Pawson, T. und Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-80.
- Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J. und Sturgill, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* 10, 885-92.
- Peraino, C., Fry, R. J. und Staffeldt, E. (1971). Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res* 31, 1506-12.
- Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 100, 201-20.
- Petit, P. X., Susin, S.-A., Zamzami, N., Mignotte, B. und Kroemer, G. (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS-Lett* 396, 7-13.
- Pietenpol, J. A., Holt, J. T., Stein, R. W. und Moses, H. L. (1990). Transforming growth factor  $\beta$ 1 suppression of *c-myc* gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3758-62.
- Polyak, K., Lee, M.-H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. und Massagué, J. (1994). Cloning of p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.
- Porter, A. G. (1999). Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 9, 394-401.

Pouponnot, C., Jayaraman, L. und Massagué, J. (1998). Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem* 273, 22865-8.

Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C. und Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275, 967-9.

Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S. und Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Cell* 69, 597-604.

Reed, J. C. (1997a). Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell* 91, 559-62.

Reed, J. C. (1997b). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-6.

Reisenbichler, H., Chari, R. S., Boyer, I. J. und Jirtle, R. L. (1994). Transforming growth factor- $\beta$  receptors type I, II and III in phenobarbital-promoted rat liver tumors. *Carcinogenesis* 15, 2763-7.

Roberts, A. B., Sporn, M. B. (1990). The transforming growth factor betas. In *Peptide growth factors and their receptors*. Edited by Roberts, A. B., Sporn, M. B. Heidelberg: Springer-Verlag; 1990: 419-72.

Romashkova, J. A. und Makarov, S. S. (1999). NF- $\kappa$ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.

Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. und Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-9.

Rossi, L., Ravera, M., Repetti, G. und Santi, L. (1977). Long-term administration of DDT or phenobarbital-Na in Wistar rats. *Int J Cancer* 19, 179-85.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A. und Becker, J. W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-25.

Russell, W. E., Coffey, R. J., Jr., Ouellette, A. J. und Moses, H. L. (1988). Type  $\beta$  transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5126-30.

Ryan, J. J., Prochownik, E., Gottlieb, C. A., Apel, I. J., Merino, R., Núñez, G. und Clarke, M. F. (1994). c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5878-82.

Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S. und Orrenius, S. (1999). Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 6, 495-6.

Sánchez, A., Álvarez, A. M., Benito, M. und Fabregat, I. (1996). Apoptosis induced by transforming growth factor- $\beta$  in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 271, 7416-22.

Sara, V. R. und Hall, K. (1990). Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70, 591-614.

- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. und Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-6.
- Savas, Ü., Griffin, K. J., Johnson, E. F. (1999). Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: an expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol* 56, 851-7.
- Scaife, J. F. (1966). The effect of lethal doses of x-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome c. *Can J Biochem* 44, 433-48.
- Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A. und Weber, M. J. (1998). MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281, 1668-71.
- Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M. und Reed, J. C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5113-8.
- Schendel, S. L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B. L. und Reed, J. C. (1999). Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* 274, 21932-6.
- Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. und Korsmeyer, S. J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11357-62.
- Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J. und Timmermann-Trosiener, I. (1981). Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin. *Cancer Res* 41, 2556-62.
- Schulte-Hermann, R., Schuppler, J., Timmermann-Trosiener, I., Ohde, G., Bursch, W. und Berger, H. (1983). The role of growth of normal and preneoplastic cell populations for tumor promotion in rat liver. *Environ Health Perspect* 50, 185-94.
- Schulte-Hermann, R. (1985). Tumor promotion in the liver. *Arch Toxicol* 57, 147-58.
- Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G. und Bursch, W. (1990). DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res* 50, 5127-35.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W. und Grasl-Kraupp, B. (1995). Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease. *Prog Liver Dis* 13, 1-35.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Torok, L., Ellinger, A. und Mullauer, L. (1995). Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol Lett* 82-83, 143-8.
- Schweichel, J. U. und Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-66.
- Searle, J., Kerr, J. F. und Bishop, C. J. (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17 Pt 2, 229-59.

Selvakumaran, M., Lin, H. K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Hoffman, B. und Liebermann, D. (1994). Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF $\beta$ 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 9, 1791-8.

Shapiro, H. M. (1984). *Practical flow cytometry*. Second Edition. New York: Alan R Liss, Inc.

Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-7.

Shi, Y., Wang, Y.-F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J. und Pavletich, N. P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- $\beta$  signaling. *Cell* 94, 585-94.

Shimizu, S., Narita, M. und Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-7.

Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M. und Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354, 494-6.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.

Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M. und Assoian, R. K. (1986). Transforming growth factor- $\beta$ : biological function and chemical structure. *Science* 233, 532-4.

Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K. W. und Schwarz, M. (1995). Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis* 16, 1271-5.

Stroh, C. und Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell-Death-Differ* 5, 1350-9047.

Sturgill, T. W., Ray, L. B., Erikson, E. und Maller, J. L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334, 715-8.

Sue, S. R., Chari, R. S., Kong, F.-M., Mills, J. J., Fine, R. L., Jirtle, R. L. und Meyers, W. C. (1995). Transforming growth factor-beta receptors and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 222, 171-8.

Suffys, P., Beyaert, R., De Valck, D., Vanhaesebroeck, B., Van Roy, F. und Fiers, W. (1991). Tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase-A2 activity, but not with arachidonic acid release per se. *Eur J Biochem* 195, 465-75.

Sugden, P. H. und Clerk, A. (1997). Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 9, 337-51.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. und Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184, 1331-41.

- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H. G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J. C. und Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med* 186, 25-37.
- 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., Aebbersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. und Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-6.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prévost, M. C., Alzari, P. M. und Kroemer, G. (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-94.
- Takase, M., Imamura, T., Sampath, T. K., Takeda, K., Ichijo, H., Miyazono, K. und Kawabata, M. (1998). Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 26-9.
- Tanaka, S. und Wands, J. R. (1996). Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor  $\beta$ 1-induced apoptosis. *Cancer Res* 56, 3391-4.
- Tang, B., Böttinger, E. P., Jakowlew, S. B., Bagnall, K. M., Mariano, J., Anver, M. R., Letterio, J. J. und Wakefield, L. M. (1998a). Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med* 4, 802-7.
- Tang, D. G., Li, L., Zhu, Z. und Joshi, B. (1998b). Apoptosis in the absence of cytochrome c accumulation in the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 242, 380-4.
- Tennekes, H. A., Wright, A. S., Dix, K. M. und Koeman, J. H. (1981). Effects of dieldrin, diet, and bedding on enzyme function and tumor incidence in livers of male CF-1 mice. *Cancer Res* 41, 3615-20.
- Tennekes, H. A., Edler, L. und Kunz, H. W. (1982). Dose-response analysis of the enhancement of liver tumour formation in CF-1 mice by dieldrin. *Carcinogenesis* 3, 941-5.
- Thoresen, G. H., Refsnes, M. und Christoffersen, T. (1992). Inhibition of hepatocyte DNA synthesis by transforming growth factor  $\beta$ 1 and cyclic AMP: effect immediately before the G1/S border. *Cancer Res* 52, 3598-603.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. und et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* 356, 768-74.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T. und Nicholson, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-11.
- Thornberry, N. A. und Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.

Topper, J. N., Cai, J., Qiu, Y., Anderson, K. R., Xu, Y. Y., Deeds, J. D., Feeley, R., Gimeno, C. J., Woolf, E. A., Tayber, O., Mays, G. G., Sampson, B. A., Schoen, F. J., Gimbrone, M. A., Jr. und Falb, D. (1997). Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 9314-9.

Topper, J. N., DiChiara, M. R., Brown, J. D., Williams, A. J., Falb, D., Collins, T. und Gimbrone, M. A., Jr. (1998). CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor  $\beta$  transcriptional responses in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9506-11.

Tsai, M.-J. und O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* *63*, 451-86.

Tsujimoto, Y. und Croce, C. M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 5214-8.

Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. und Wrana, J. L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF $\beta$  receptor. *Cell* *95*, 779-91.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T. und Thompson, C. B. (1997). Bcl-x<sub>L</sub> regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* *91*, 627-37.

Vaux, D. L. (1999). Caspases and apoptosis - biology and terminology. *Cell Death Differ* *6*, 493-4.

Vindovoghel, L., Kon, A., Lechleider, R. J., Uitto, J., Roberts, A. B. und Manuviel, A. (1998). Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promotor by transforming growth factor- $\beta$ . *J Biol Chem* *273*, 13053-7.

Walker, N. P. C., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D. et al. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* *78*, 343-52.

Wang, H.-G., Rapp, U. R. und Reed, J. C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* *87*, 629-38.

Wen, L. P., Madani, K., Fahrni, J. A., Duncan, S. R. und Rosen, G. D. (1997). Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN- $\gamma$  and Fas. *Am J Physiol* *273*, L921-9.

White, M. F. (1998). The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* *182*, 3-11.

Whitmarsh, A. J. und Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* *74*, 589-607.

Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J. und Davis, R. J. (1998). A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* *281*, 1671-4.

- Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A. und et al. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Nature* 370, 270-5.
- Wollenberg, G. K., Semple, E., Quinn, B. A. und Hayes, M. A. (1987). Inhibition of proliferation of normal, preneoplastic und neoplastic rat hepatocytes by transforming growth factor- $\beta$ . *Cancer Res* 47, 6595-9.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. und Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139, 1281-92.
- Wong, C., Rougier-Chapman, E. M., Frederick, J. P., Datto, M. B., Liberati, N. T., Li, J.-M. und Wang, X.-F. (1999). Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor  $\beta$ . *Mol Cell Biol* 19, 1821-30.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-6.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. und Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-31.
- Xiang, J., Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14559-63.
- Xu, Q. und Reed, J. C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1, 337-46.
- Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. und Miyazono, K. (1999). Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem* 274, 703-9.
- Yamamoto, M., Ogawa, K., Morita, M., Fukuda, K. und Komatsu, Y. (1996). The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta_1$ . *Hepatology* 23, 552-9.
- Yamamoto, M., Fukuda, K., Miura, N., Suzuki, R., Kido, T. und Komatsu, Y. (1998). Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor  $\beta_1$ -induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology* 27, 959-66.
- Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Toriyabe, T., Kawabata, M., Miyazono, K. und Kato, S. (1999). Convergence of transforming growth factor- $\beta$  and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 283, 1317-21.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. und Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-91.
- Yang, X., Khosravi Far, R., Chang, H. Y. und Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067-76.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. und Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-32.

Yang, X., Chang, H. Y. und Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol Cell* 1, 319-25.

Yano, S., Tokumitsu, H. und Soderling, T. R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396, 584-7.

Yin, C., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J. und Van Dyke, T. (1997). Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*. *Nature* 385, 637-40.

Yingling, J. M., Datto, M. B., Wong, C., Frederick, J. P., Liberati, N. T. und Wang, X. F. (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor  $\beta$ -inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 17, 7019-28.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. und Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 75, 641-52.

Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gómez-Monterrey, I., Castedo, M. und Kroemer, G. (1996a). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183, 1533-44.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Marse, B. und Kroemer, G. (1996b). Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 384, 53-7.

Zawel, L., Dai, J. L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. und Kern, S. E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1, 611-7.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. und Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X<sub>L</sub>. *Cell* 87, 619-28.

Zhang, Y., Feng, X.-H., Wu, R.-Y. und Derynck, R. (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- $\beta$  response. *Nature* 383, 168-72.

Zhang, Y., Feng, X. H. und Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- $\beta$ -induced transcription. *Nature* 394, 909-13.

Zhang, Y. und Derynck, R. (1999). Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol* 9, 274-9.

Zoratti, M. und Szabò, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139-76.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. und Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-13.

**6.3 Akademische Lehrer**

K. Albert	H. Metzner
E. Bayer	P. Münzel
H. Bisswanger	U. Nagel
K.W. Bock	W. Nakel
P. Bohley	H. Oberhammer
V. Braun	D. Oelkrug
U. Breyer-Pfaff	E. Pfaff
S. Bröer	B. Pfeiffer
A. Buchmann	W. Pfeiffer
K. Eisele	H. Pommer
K.U. Fröhlich	K. Poralla
G. Gauglitz	H. Probst
R. Gebhardt	H.J. Reinecke
P. Grabmayr	K. Reutter
H. Günzl	F. Schöffl
H. Hagenmaier	D. Schrenk
B. Hamprecht	M. Schwarz
M. Hanack	H. Stegmann
H. Hipp	J. Strähle
V. Hoffmann	W. Voelter
F. Jähmig	G.J. Wagner
G. Jung	K. Wegmann
G. Kissling	U. Weser
D. Krug	J. Werringloer
E. Lindner	H. Wiesinger
W.E. Mayer	H. Zähler
D. Mecke	

## **6.4 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Christoph Lars Bünemann

geboren am 31. Juli 1969 in Speyer am Rhein

### **Schulausbildung**

1976 - 1980 Besuch der Woogbachschule in Speyer

1980 - 1989 Besuch des Staatl. Hans-Purrmann-Gymnasiums Speyer

1989 Erreichen der allgemeinen Hochschulreife

### **Wehrersatzdienst**

1990 - 1991 Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz, Speyer

### **Studium**

1991 - 1997 Biochemie-Diplomstudium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen

### **Promotion**

1997 - 2000 Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Toxikologie der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von  
Prof. Dr. K. W. Bock und Prof. Dr. M. Schwarz: „Molekulare  
Mechanismen der Inhibition TGF- $\beta$ -induzierter Apoptose in  
Hepatomzellen“ von Mai 1997 bis Februar 2000