

**Apoptosemodulation nach selektiver Inhibition der
Cyclooxygenase-2 (COX-2) in humanen
Lebertumorzelllinien**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anke Maria Haugg

aus Augsburg

2008

Berichtersteller:

Prof. Dr. Jens Brüning

Prof. Dr. Martin Krönke

Tag der mündlichen Prüfung:

26.06.2008

Für Anna, Gerhard
und
Vincent

In stillem Gedenken an
Anni
und
Johann

"τίς δ' οἶδεν, εἰ τὸ ζῆν μὲν ἔστι κατθανεῖν,
τὸ κατθανεῖν δὲ ζῆν;"

"Wer weiß, ob unser Leben nicht ein Tod nur ist,
Gestorben sein dagegen Leben?"

Euripides (480 - 406 v. Chr.),

zitiert (wahrscheinlich aus

dem verloren gegangenen "Polyeidos" des Euripides)

in "Gorgias" (492 E), Platon (427 - 347 v. Chr.)

Übersetzung von Friedrich D. E. Schleiermacher (1768 - 1834)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Das hepatozelluläre Karzinom	1
1.2. Die Cyclooxygenase-2	2
1.2.1. Die Cyclooxygenase-2 ist ein Enzym des Prostaglandinstoffwechsels.....	2
1.2.2. Die Expression der Cyclooxygenase-2	3
1.2.3. Die Cyclooxygenase-2 ist im hepatozellulären Karzinom dysreguliert	3
1.2.4. Die kanzerogene Wirkung der Cyclooxygenase-2	5
1.3. SC-58635, aus der Wirkstoffgruppe der NSARs, inhibiert die Cyclooxygenase-2 selektiv	5
1.4. Der programmierte Zelltod, die Apoptose.....	7
1.5. Caspasen leiten als proteolytische Enzyme Apoptosesignale weiter	8
1.6. Der intrinsische Apoptosesignalweg führt über die Mitochondrien	10
1.7. Die Proteine der BCL-2-Familie beeinflussen die Mitochondrien in einem komplexen Zusammenspiel.....	12
1.7.1. MCL-1, ein antiapoptotischer Vertreter der BCL-2-Familie	14
1.7.2. BAX öffnet die Poren der Mitochondrienmembran.....	16
1.7.3. BID nimmt eine Sonderstellung als Vermittler zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg ein	16
1.8. Die Todesrezeptoren vermitteln mit ihren korrespondierenden Liganden die Apoptose extrinsisch.....	17
1.8.1. Die Signalvermittlung an die Todesrezeptoren erfolgt parakrin und autokrin	18
1.8.2. Charakteristika der CD95 und TRAIL vermittelten Apoptose	19
1.8.2.1. Der CD95-Rezeptor leitet je nach Zelltyp zwei unterschiedliche Signalwege ein	20
1.8.3. TNF-Rezeptor vermittelte Apoptose	20
1.9. p53 ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen.....	22
1.10. Der Einsatz von Chemotherapeutika – eine klinische Anwendung der Apoptose...23	
1.11. Beschreibung der ausgewählten Zelllinien	24
1.12. Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Material	26
2.1.1. Chemikalien, Bioreagenzien, <i>Kits</i>	26

2.1.2.	Immunreagenzien, Proteine, Inhibitoren	27
2.1.3.	<i>Primer</i> , Nukleotide	28
2.1.4.	Adenovirale Konstrukte	28
2.1.5.	Eukaryote Zellen	30
2.1.5.1.	HepG2, Hepatoblastomzellen	30
2.1.5.2.	HuH-7, Hepatoblastomzellen	30
2.1.5.3.	T47D, Mammakarzinomzellen	30
2.1.5.4.	HEK 293-Zellen	30
2.1.6-	Medien für die Zellkultur	30
2.1.7.	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Untersuchungen	31
2.1.8.	Gele	33
2.1.9.	Geräte und Verbrauchsmaterial	34
2.1.10.	<i>Software</i>	34
2.2.	Methoden	35
2.2.1.	Kultur der Zelllinien	35
2.2.2.	Kultur von primären Hepatozyten	36
2.2.3.	Prokaryote Zellkultur	36
2.2.3.1.	Aufzucht und Reinigung von Adenoviren	36
2.2.3.2.	Titerbestimmung	37
2.2.4.	Behandlungen der Zellen	37
2.2.4.1.	Behandlung mit SC-58635	37
2.2.4.2.	Zugabe von PGE ₂	37
2.2.4.3.	Inhibition der Caspasen	38
2.2.4.4.	Stimulierung der Todesrezeptoren CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 ...	38
2.2.4.5.	Behandlung mit Zytostatika	39
2.2.5.	Subzelluläre Lokalisation von COX-2 mittels immunhistochemischer Färbung in unbehandelten Hepatomzellen	39
2.2.6.	Vitalitäts-Test (MTT)	40
2.2.7.	FACS-Analysen	40
2.2.7.1.	Apoptosenachweis mit Nicoletti-Färbung	41
2.2.7.2.	Nachweis der Mitochondrienaktivierung über die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1-Färbung	42
2.2.7.3.	Nachweis der Mitochondrienaktivierung über die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit DiOC ₆ (3)-Färbung	43
2.2.7.4.	Färbung der Todesrezeptoren für die FACS-Analyse	45
2.2.8.	Apoptosenachweis mit DAPI-Färbung	46
2.2.9.	Test zur Caspasenaktivierung	46

2.2.10.	Transfektion von Hepatomzellen	47
2.2.10.1.	Transiente Transfektion von siRNA mit TransFectin	47
2.2.10.2.	Transiente Transfektion von cDNA mit FuGene 6	47
2.2.11.	Adenovirale Transduktion	48
2.2.12.	Nachweise auf Proteinebene	49
2.2.12.1.	Nukleäre und zytoplasmatische Proteinlysate.....	49
2.2.12.2.	Mitochondriale Proteinlysate	49
2.2.12.3.	Gesamtproteinlysate	50
2.2.12.4.	Proteinbestimmung.....	50
2.2.12.5.	Western-Blotanalyse.....	51
2.2.13.	Statistische Analysen.....	54
3.	Ergebnisse	55
3.1.	Expression der Cyclooxygenase-2 in Hepatom-Zellen	55
3.2.	SC-58635 vermittelte Apoptoseinduktion	57
3.3.	Aktivierung von Caspasen während der selektiven COX-2-Blockade durch SC-58635	61
3.4.	Charakterisierung des mitochondrien-vermittelten, intrinsischen Signalweges nach spezifischer COX-2-Inhibition durch SC-58635 in Hepatom-Zellen	65
3.4.1.	Einfluss der SC-58635-Behandlung auf das mitochondriale Membranpotential	65
3.4.2.	Einfluss von CASP-8 und CASP-3 auf die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials	68
3.4.3.	SC-58635 induzierte CYT-C-Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma	69
3.4.4.	Analyse pro- und antiapoptotischer Proteine der BCL-2-Familie nach selektiver COX-2-Blockade.....	70
3.4.4.1.	Rolle des antiapoptotischen MCL-1 bei der SC-58635 induzierten Apoptose.....	70
3.4.4.2.	Translokation von BAX an die Mitochondrien.....	74
3.4.4.3.	Translokation von BID an die Mitochondrien	76
3.5.	Charakterisierung des extrinsischen Signalweges nach SC-58635 induzierter Apoptose	78
3.5.1.	Beteiligung von FADD während der SC-58635 induzierten Apoptose	78
3.5.1.1.	Einfluss von FADD auf die Mitochondrien.....	79
3.5.2.	Kinetik der Todesrezeptoren an der Zellmembran.....	80
3.5.3.	Einfluss von SC-58635 auf die Sensitivität der Todesrezeptoren für ihre entsprechenden Liganden.....	82
3.6.	Einfluss der selektiven COX-2-Blockade, durch SC-58635, auf die Wirkung von Chemotherapeutika in Hepatomzellen.....	83
3.6.1.	Behandlung von primären Hepatozyten mit SC-58635 alleine und in Kombination mit Zytostatika	85

3.6.2.	Beteiligung des extrinsischen Signalweges in Hepatomzellen bei der Kombinationsbehandlung von SC-58635 mit Chemotherapeutika.....	86
4.	Diskussion	88
4.1.	SC-58635 induzierte Apoptose durch selektive COX-2-Inhibierung in Hepatomzelllinien.....	88
4.2.	Charakterisierung des intrinsischen Signalweges über die Mitochondrien nach selektiver COX-2-Blockade.....	90
4.2.1.	Relevanz des antiapoptotischen MCL-1-Proteins im SC-58635 induzierten Apoptosesignalweg.....	90
4.2.2.	Beteiligung von BAX im intrinsischen Signalweg nach selektiver COX-2-Blockade	92
4.2.3.	Beteiligung von BID im intrinsischen Signalweg nach selektiver COX-2-Blockade	93
4.3.	Charakterisierung des extrinsischen Signalweges über die Todesrezeptoren.....	95
4.3.1.	Kinetik und Sensitivierung des CD95-Rezeptors.....	96
4.3.2.	TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in der SC-58635 induzierten Apoptose.....	98
4.3.3.	Regulierung und Sensitivierung des TNF-R1	100
4.3.4.	Zusammenfassende Diskussion zur Aktivierung der Todesrezeptoren.....	101
4.4.	Therapeutische Relevanz der SC-58635 induzierten selektiven COX-2-Blockade im HCC.....	103
5.	Zusammenfassung	106
6.	Abstract.....	107
7.	Literaturverzeichnis	108
8.	Teilpublikationen.....	125
	Originalarbeiten.....	125
	Ausgewählte Kongressbeiträge.....	125
	Auszeichnungen	126
	Danksagung an... ..	127
	Schlusserklärung	130

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Prostaglandinstoffwechsel	2
Abb. 2:	Kokalisation der Gene <i>cox-2</i> und <i>cpla2</i> auf dem Chromosomenarm 1q.....	4
Abb. 3:	Strukturformeln von NSARs.....	6
Abb. 4:	Schematische Darstellung von Initiator- und Effektorcaspasen	8
Abb. 5:	Modell der Caspase-8-Aktivierung	9
Abb. 6:	Modellvorstellungen der Permeabilisierung von Mitochondrienmembranen.....	11
Abb. 7:	Schematische Darstellung und Klassifizierung einiger BCL-2- Familienmitglieder	13
Abb. 8:	Funktionsweise der BCL-2 Familienmitglieder.....	14
Abb. 9:	DISC-Bildung am CD95-Rezeptor.....	19
Abb. 10:	Die TNF-R1 medierte Apoptose erfolgt über die Bildung von Komplex I und Komplex II	21
Abb. 11:	Restriktionskarte des adenoviralen Vektors pACCMV.PLPASR.....	28
Abb. 12:	Beschreibung des FADD Δ^- -Moleküls auf Protein- und DNA-Ebene	29
Abb. 13:	FACS-Analyse der Nicoletti-Färbung von HepG2-Zellen	41
Abb. 14:	JC-1-Färbung von HuH-7-Zellen.....	43
Abb. 15:	DiOC6(3)-Färbung von HuH-7-Zellen.....	44
Abb. 16:	Titration von Ad β -Gal und Ad fadd Δ^-	48
Abb. 17:	Beispiel für eine Protein-Eichgerade.....	50
Abb. 18:	Expression von COX-2 in HepG2- und HuH-7-Zellen.....	55
Abb. 19:	Expression der Prostaglandinrezeptoren EP1 und EP2 in HepG2- und HuH-7-Zellen	56
Abb. 20:	Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 gemessen an der relativen Anzahl lebender HepG2- Zellen (Zellvitalität).....	57
Abb. 21:	Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 gemessen an der Zellvitalität (relative Anzahl lebender Zellen) von HuH-7-Zellen.	58
Abb. 22:	Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 (0, 10, 25, 50, 100, 200 und 400 μ M) auf die relative Anzahl der Apoptoseereignisse (Nicoletti- Färbung) in HepG2-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten	59
Abb. 23:	Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 (0, 10, 25, 50, 100, 200 und 400 μ M) auf die relative Anzahl der Apoptoseereignisse (Nicoletti- Färbung) in HuH-7-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	60
Abb. 24:	DAPI-Färbung der mit SC-58635 behandelten Zellen nach 48 Stunden	60
Abb. 25:	Nachweis der erhöhten (n-fach) enzymatischen Aktivität der Caspasen in HepG2-Zellen nach zwei und 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 μ M).....	62
Abb. 26:	Nachweis der erhöhten (n-fach) enzymatischen Aktivität der Caspasen in HuH-7 nach zwei und 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 μ M)	62
Abb. 27:	Funktioneller Nachweis der Caspasenbeteiligung an der SC-58635 vermittelten Apoptose.....	63
Abb. 28:	Aktivierung der CASP-8 in HepG2- und HuH-7-Zellen während fünf Minuten bis 2 Stunden SC-58635-Behandlung (100 μ M).....	64
Abb. 29:	Änderung des Membranpotentials während ein bis zwei Stunden SC- 58635-Behandlung (100 μ M) von HepG2-und HuH-7-Zellen.....	66
Abb. 30:	Dosisabhängige Änderung des Membranpotentials während einer Stunde SC-58635-Behandlung (50 und 100 μ M) von HepG2- und HuH-7-Zellen	66
Abb. 31:	PGE ₂ verhindert die SC-58635 abhängige Depolarisierung der Mitochondrienmembran in HuH-7-Zellen.....	67

Abb. 32: Funktioneller Nachweis der Caspasenbeteiligung an der SC-58635 vermittelten Änderung des mitochondrialen Membranpotentials.....	68
Abb. 33: CYT-C-Freisetzung ins Zytoplasma nach einer Stunde selektiver COX-2- Blockade (100 μ M SC-58635) von HuH-7-Zellen	69
Abb. 34: Abbau von MCL-1 in den Mitochondrien während 24 Stunden SC- 58635-Behandlung (100 μ M).....	71
Abb. 35: Gesamtproteingehalt von MCL-1 während 24 Stunden SC-58635- Behandlung (100 μ M)	71
Abb. 36: MCL-1-Expression nach Transfektion von siRNA gfp und siRNA mcl-1	72
Abb. 37: Die Inhibierung von antiapoptotischem MCL-1 durch Transfektion mit siRNA mcl-1 führt während 24 Stunden SC-58635-Behandlung mit 100 μ M zu einer signifikanten Apoptosesteigerung im Vergleich zur Kontrolle mit siRNA gfp	73
Abb. 38: Überexpression von Mcl-1 durch Transfektion von mcl-1-cDNA führt innerhalb 48 Stunden SC-58635-Behandlung mit 100 μ M zu einer signifikanten Apoptosereduktion im Vergleich zur Kontrolle mit Leervektor	74
Abb. 39: Unveränderter BAX-Gesamtstatus während 24 Stunden SC-58635- Behandlung (100 μ M)	75
Abb. 40: Anreicherung von BAX an den Mitochondrien während 24 Stunden SC- 58635-Behandlung (100 μ M).....	75
Abb. 41: Western-Blotanalyse von v.L.BID (22 kDa) und tBID (15 kDa) innerhalb 24 Stunden SC-58635 Behandlung von HepG2-Zellen.....	76
Abb. 42: Western-Blotanalyse von v.L.Bid (22 kDa) und tBID (15 kDa) in HuH-7- Zellen innerhalb 24 Stunden SC-58635-Behandlung.....	77
Abb. 43: Inhibition von FADD durch adenoviralen Gentransfer mit fadd Δ - verringert die Apoptose nach 48 Stunden SC-58635-Behandlung signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Ad β -Gal.....	79
Abb. 44: FADD Δ reduziert die Aktivierung der Mitochondrien.....	80
Abb. 45: Kinetik der Todesrezeptoren an der Zellmembran über 24 Stunden SC- 58635 Behandlung mit 100 μ M	81
Abb. 46: Sensitivierung der Todesrezeptoren mit 100 μ M SC-58635 (24 Stunden)	83
Abb. 47 SC-58635 sensitiviert HepG2-Zellen für die chemotherapeutisch induzierte Apoptose.....	84
Abb. 48: SC-58635 sensitiviert HuH-7-Zellen für die chemotherapeutisch induzierte Apoptose.....	85
Abb. 49: Die Chemosensitivität wird nach selektiver COX-2-Inhibition in PHHs nicht erhöht	85
Abb. 50: FADD Δ - reduziert die SC-58635 mediierte Chemosensitivität in HepG2-Zellen.....	86
Abb. 51: FADD Δ - reduziert die SC-58635 mediierte Chemosensitivität in HuH-7- Zellen	87
Abb. 52: Modellvorstellung. Die selektive COX-2-Blockade, induziert durch SC- 58635, führt zur Caspasenspaltung und Aktivierung der Mitochondrien über Mitglieder der BCL-2 Familie.....	94
Abb. 53: Modellvorstellung. HepG2- und HuH-7-Zellen bevorzugen unterschiedliche Todesrezeptoren zur Apoptoseexekution nach selektiver COX-2-Inhibition durch SC-58635	102

Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>arachidonic acid</i>
Abb.	Abbildung
Ad	adenoviral
AFC	7-Amino-4-Trifluoromethylcumarin
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AKT	PKB
altgr.	altgriechisch
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ANT	<i>adenine nucleotide translocator</i>
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor</i>
APC	<i>adenomatosis polyposis coli</i>
APO-1	CD95 bzw. FAS
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2-analogous protein X</i>
BCL	<i>B-cell-lymphoma</i>
BCL-XL	<i>B-cell-lymphoma X long</i>
BH	BCL-2 Homolog
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>BCL-2 interacting mediator of cell death</i>
BOP	BH3-only Protein
BSA	bovines Serum Albumin
C3I	Caspase-3-Inhibitor
C8I	Caspase-8-Inhibitor
C9I	Caspase-9-Inhibitor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CL	Cardiolipin
CASP	<i>cysteine-aspartate proteases</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-Propansulfonat-Hydrat
COX-2	Cyclooxygenase-2
cPLA2	cytosolische Phospholipase A2
Cycline	regulatorische Untereinheiten der CDKs
Cyp D	Cyclophilin D
CYT-C	Cytochrom-c
d.h.	das heißt
DAB	Di-Amino-Benzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid
dATP	2'-deoxyAdenosin 5'-Triphosphat
DD	<i>death domain</i>
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DiOC6 (3)	3,3-Dihexyloxacarbocyanin-Jodid
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	Dulbecco's <i>modified</i> Eagle's Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>death receptor</i>
DTT	(R,R)-Dithiothreitol; (R,R)-1,4-Dimercapto-2,3-Butandiol;
dUTP	deoxy-Uridintriphosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDAR	Ectodysplasin-Rezeptor
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ehem.	ehemalig
EP1	Prostaglandin E-Rezeptor1
EP2	Prostaglandin E-Rezeptor2
EP3	Prostaglandin E-Rezeptor3
EP4	Prostaglandin E-Rezeptor4
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorter</i>
FADD	FAS (CD95)-associated via death domain
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FAS	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fig.	<i>figure</i>
FL	Fluoreszenz
FLICE	ehemaliges Synonym für CASP-8
FLIP	<i>FADD-like apoptosis regulator</i>
FMK	Fluoromethylketon
FP	<i>receptor for prostaglandin F2 alpha</i>
FSC	<i>Forwardscatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
HaCaT	Humane adulte Haut-Keratinocyten, niedriges Kalziummilieu, erhöhte Temperatur
HAUSP	<i>herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease</i>
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HCV	Hepatitis C-Virus
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfon
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IGF II	<i>insulin like growth factor II</i>
IL-1	Interleukin-1
IP	<i>prostacyclin receptor</i>
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazol-Carbocyanin-Jodid
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K	unbehandelte Kontrolle
k.o.	<i>knock out</i>
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
konj.	konjugiert

lat.	Latein
MANOVA	multivariante ANOVA
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCL-1	myeloid cell leukemia-1
MDC	Monodansylcadaverin
MDM2	<i>mouse double minute clone 2</i>
MDP	<i>multidomain proteins</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
moi	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-tiazolyl)-2,5-Tetrazoliumbromid
mut.	mutiert
MW	<i>molecular weight</i>
n	Anzahl
NGF	<i>neuronal growth factor</i>
nm	Nanometer
NOXA	lat. "Schaden"
NSAID	<i>nonsteroidal antiinflammatory drug</i>
NSAR	nicht steroidale Anti-Rheumatika
OD	Optische Dichte
<i>P</i>	Signifikanzangabe
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pCI	Pan-Caspase-Inhibitor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase, Isozym 1
PE	Phycoerythrin
PEST	Prolin (P), Glutamat o. Aspartat (E), Serin (S), Threonin (T)
PG	Prostaglandin
PGD	Prostaglandin D
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF	Prostaglandin F
PGG ₂	Hydroperoxyendoperoxid 2
PGH ₂	Prostaglandin Hydroxyendoperoxid 2
PGHS	Prostaglandinsynthase H
PGI ₂	Prostacyclin
PHH	primäre humane Hepatozyten
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis (2-Ethansulfonsäure)
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR δ	<i>peroxisome proliferative activated receptor, delta isoform 2;</i>
PTPC	<i>permeability transition pore complex</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
R	Rezeptor
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RIPA	<i>radio-immuno-precipitation-assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>round per minute</i>

RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
s.	siehe
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
SC-58635	Celecoxib
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	so genannte
sPLA2	<i>secretory phospholipase A2</i>
SRC	<i>Rous sarcoma</i>
SSC	<i>Sidewardscatter</i>
tBID	<i>truncated BID</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TdT	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRADD	<i>tumor necrosis factor receptor (TNFR)1-associated death domain</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick-end labeling</i>
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
V	Volumen
v.L.	volle Länge
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
W	<i>weight</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Z-DEVD-FMK	Z-Asp(OCH ₃)-Glu(OCH ₃)-Val-Asp(OCH ₃)-Fluoromethylketon, C3I
Z-IETD-FMK	Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-Fluoromethylketon, C8I
Z-LEHD-FMK	Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-Fluoromethylketon, C9I
Z-VAD-FMK	Z-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluoromethylketon, pCI
°C	Grad Celsius
β-Gal	β-Galaktosidase
Δ ⁻	dominant-negativ
ψ	Membranpotential
Anoikis	heimatlos: altgr. οίκος (oikos), "Haus"
Apoptose	altgr. απο (apo), weg und πτωσις (ptosis), "Fall"
Nekrose	altgr. νεκρός (nekros), "Leichnam"
Zeiose	altgr. ζειω (zeio), "ich koche"

1. Einleitung

1.1. Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört weltweit zu den häufigen hoch malignen Erkrankungen (1) und ist für ca. sechs Prozent aller humanen Krebserkrankungen und jährlich eine Million Sterbefälle verantwortlich (2-4). So liegt für HCC-Patienten die Ein-Jahres-Überlebensrate bei 17 - 44 %, die Drei-Jahres-Überlebensrate bei 8 - 17 % und die Fünf-Jahres-Überlebensrate unter fünf Prozent (3, 5-8). Seine stärkste Verbreitung findet es in Afrika und fernöstlichen Ländern, wie z.B. Japan und China. Aber auch in den westlichen Industrienationen nimmt die Erkrankungshäufigkeit stetig zu und stellt eine zunehmende gesundheitliche Bedrohung dar (1). In den USA stieg in den letzten 25 Jahren die Inzidenz des HCCs signifikant von 1,4 pro 100.000 Einwohner auf 2,4 pro 100.000 Einwohner, was einer Zunahme um 71 % entspricht (7, 9). Die häufigsten Ursachen für die Entstehung eines HCC sind gerade in fernöstlichen Ländern Aflatoxinvergiftungen, Hepatitis-B-Virus (HBV)- und Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektionen. Die Virus-Hepatitis-Infektionen gewinnen zudem immer mehr an Bedeutung in den Industrieländern (10). Studien in Italien und den Vereinigten Staaten verwiesen auf die Bedeutung von alkoholisch induzierten Leberzirrhosen für die Entstehung des HCCs (11). Bis zu 45 % der HCC-Erkrankungen waren auf den Alkoholabusus zurückzuführen, dabei wirkt sich Alkoholmissbrauch besonders schwerwiegend bei Hepatitis-C-Patienten aus. Ihr Risiko für ein HCC verdoppelt sich im Vergleich zum Risiko für Patienten mit einer alleinigen HCV-Infektion. Adjuvante Therapieoptionen wie Radio- oder Chemotherapie aber auch präventive Chemotherapeutika fehlen noch immer.

Neue Perspektiven einer medikamentösen Therapie für das HCC bieten möglicherweise nicht steroidale Anti-Rheumatika (NSARs), auch unter dem englischen Synonym *non steroidal antiinflammatory drugs* (NSAIDs) bekannt. Neben ihrer antiinflammatorischen Wirkung, welche durch die Inhibition der Cyclooxygenase-2 (COX-2), ein Enzym des Prostaglandinstoffwechsels, erzielt wird, wurden auch antitumorogene Effekte berichtet (s. Kap. 1.3.).

In der vorliegenden Arbeit wurden nun mögliche Apoptose induzierende Effekte der NSARs auf das HCC *in vitro* untersucht. Dabei wurden stellvertretend für das HCC Hepatomzelllinien (Kap. 1.11.) und als NSAR, SC-58635, ausgewählt.

1.2. Die Cyclooxygenase-2

1.2.1. Die Cyclooxygenase-2 ist ein Enzym des Prostaglandinstoffwechsels

Cyclooxygenasen sind zentrale Enzyme des Prostaglandinstoffwechsels (Abb. 1) und sind in zwei Isoformen vertreten: Die Cyclooxygenase-1 wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert (12) und dient homöostatischen Funktionen wie beispielsweise der Zytoprotektion oder der Aggregation der Blutplättchen (13, 14). COX-2 hingegen wird als Reaktion unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen oder Krebserkrankungen induziert (15, 16). Als Substrat der COX-2 dient die Arachidonsäure, eine ω -6-Fettsäure, welche als Baustein der membrangebundenen Phospholipide über die cytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) freigesetzt wird. Mit Hilfe der enzymatischen Aktivität von COX-2 wird in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Arachidonsäure in hochreaktives, kurzlebiges Hydroperoxyendoperoxid (PGG₂) umgewandelt. Die Reaktion wird durch oxidative Zyklisierung unter Wegfall zweier Doppelbindungen ausgeführt, wodurch ein zentraler C5-Ring entsteht (17). In einem zweiten Schritt reduziert COX-2 PGG₂ zu Prostaglandin Hydroxyendoperoxid (PGH₂), das gleichsam hochreaktiv ist (18). Hierbei handelt es sich um eine Vorstufe verschiedener Prostaglandine, die als zentrales Strukturelement Prostanoidsäure enthalten (17). Prostaglandin E₂ (PGE₂) geht aus dieser Vorstufe durch die katalytische Wirkung von PGE-Synthasen, welche zur Gruppe der Isomerasen gehören, hervor. Ein weiteres hochreaktives Nebenprodukt ist das Mutagen Malondialdehyd (19, 20). Ziel von

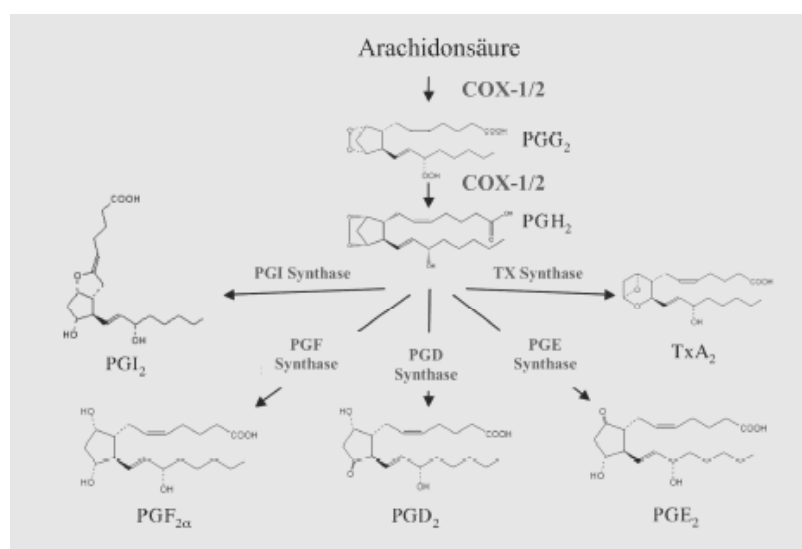


Abb. 1: Prostaglandinstoffwechsel. COX-2 katalysiert in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Arachidonsäure über PGG₂ zu PGH₂. Über die PGE-Synthase wird PGE₂ gebildet. Abbildung nach Rowley et al. (17).

PGE₂ sind die Prostaglandinrezeptoren EP1 bis EP4, welche sich durch eine unterschiedliche Affinität für ihren Liganden auszeichnen und über *second messenger* wie Ca²⁺ oder zyklisches Adenosinmonophosphat weitere Signalwege aktivieren (21).

Somit ist COX-2 nicht nur in die Reaktion auf bereits krankhafte Prozesse involviert, sondern kann im ungünstigsten Fall über die hochreaktiven, mutagenen und kanzerogenen Zwischenprodukte zusätzlich eine maligne Erkrankung induzieren.

1.2.2. Die Expression der Cyclooxygenase-2

Im Zusammenspiel mit wachstumsregulierenden Signalwegen kommen als mögliche Induktoren der COX-2 *epidermal growth factor* (EGF) (22) oder *insulin like growth factor II* (IGF II) in Frage (23). Der Wachstumsfaktor IGF II ist mit der Hepatokarzinogenese korreliert (24-26). Im Kolonkarzinom wurde gezeigt, dass IGF II über den IGF I-Rezeptor vermittelt wird (23). Eine Hochregulierung der COX-2 über die Wirkung von *tumor necrosis factor α* (TNFα) wurde im Prostatakarzinom (27) und in Lungenkarzinomzellen (28) beschrieben. In diesem Zusammenhang spielt *nuklear factor kappa B* (NFκB), welches in Hepatomzellen durch TNFα stimuliert wird (29-31), ebenfalls eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor für COX-2 (32, 33). Weitere mögliche Induktoren der COX-2 sind Interleukin-1β (IL-1β) (28, 34) und IL-2, *transforming growth factor β* (TGFβ), die Onkogene RAS und SRC (22, 33), generell genomische Veränderungen, sowie weitere auto- und parakrine Wachstumsfaktoren. Als Folge der engen Assoziation von wachstumsbeeinflussenden Faktoren mit COX-2 wird diese in zahlreichen verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert (33): Kolonkarzinom (35), Blasenkarzinom (36), Mammakarzinom (37), Lungenkarzinom (28, 38), nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (39), Prostatakarzinom (27).

1.2.3. Die Cyclooxygenase-2 ist im hepatozellulären Karzinom dysreguliert

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre demonstrierten eine Überexpression der COX-2 in HCC-Geweben und in Hepatomzelllinien (40-45). Dabei war die COX-2-Expression mit dem Differenzierungsgrad des HCC-Gewebes korreliert. In gut differenzierten HCCs der Anfangsstadien war die COX-2-Expression höher als in den schlechter differenzierten Geweben der späten Stadien oder normalen Leberzellen (40, 41, 44). Dagegen wurde aber für das direkt an HCC angrenzende Gewebe eine höhere COX-2-Expression als im HCC gezeigt, was mit Entzündungsparametern assoziiert war (42, 46). Die Prognose war deutlich schlechter für HCC-Patienten, wenn noch nicht kanzeröses Lebergewebe COX-2 exprimierte (42).

Das Genom von HCC-Tumoren ist durch eine Reihe von Chromosomenaberrationen gekennzeichnet. Viele Chromosomen weisen entweder Zugewinne oder Verluste auf (Abb. 2). Auf dem Chromosomenarm 1q wurden hierbei in den meisten der untersuchten HCC-Gewebe (46-57%) Zugewinne mit Hilfe der *comparative genomic hybridisation* (komparative genomische Hybridisierung, CGH)-Analyse registriert (47-49). Diese Chromosomenabnormalität lag vor allem in der Region 1q12-25 vor (47). Weiter ließ sich der Zuwachs mit frühen Stadien der Hepatokarzinogenese korrelieren (49). Das *cox-2*-Gen befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 1q25.2 – q25.3 (50), und liegt damit in der Kernregion von 1q, welche vor allem für chromosomale Veränderungen anfällig ist.

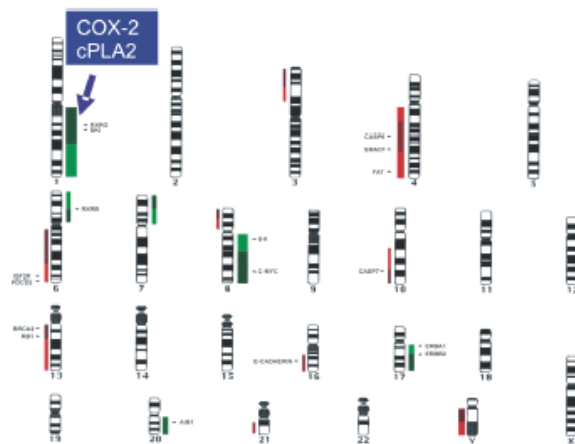


Abb. 2: Kolokalisation der Gene *cox-2* und *cpla2* auf dem Chromosomenarm 1q. Repräsentative Chromosomenkarte eines HCC. Zugewinne sind grün, Verluste rot gekennzeichnet. In mehr als 46 % der untersuchten HCC-Gewebe wurden Zugewinne in der CGH-Analyse festgestellt (47-49). Abbildung aus Niketeghad et al. (47).

Interessanterweise ist das *cox-2*- mit dem *cpla2*-Gen, welches auf 1q25 kartiert wurde (51) und dessen Protein die Bildung des Substrats der COX-2, die Arachidonsäure, katalysiert, kolokalisiert (Abb. 2).

Ein wichtiger Suppressor der COX-2 ist das Tumorsuppressorgen p53 (52-54), welches jedoch im HCC bzw. in HCC-Zelllinien häufig mutiert ist (55, 56).

1.2.4. Die kanzerogene Wirkung der Cyclooxygenase-2

Die kanzerogene Wirkung durch COX-2 ist vielfältig. So fallen in der Prostaglandinsynthese selbst hochreaktive kanzerogene bzw. mutagene Zwischenprodukte wie PGG₂, PGH₂ und Malondialdehyd an (Kap. 1.2.1.). Weiter nimmt COX-2 Einfluss auf die tumorgerichtete Immunantwort und die Neoangiogenese der Tumorzellen (13). Bei der Neoangiogenese werden für die zur Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes notwendige Mikrozirkulation, aus bereits bestehenden neue Gefäßen gebildet. Die Abwanderung von Karzinomzellen in andere gesunde Gewebe, auch als Invasion bezeichnet, wird gleichfalls COX-2 abhängig stimuliert (13). Ein weiterer protumorigener Effekt besteht in der vielfach berichteten antiapoptotischen Wirkung der COX-2 aufgrund der inversen Korrelation von COX-2-Expression zur Tumorzellapoptose (13, 57-59)

1.3. SC-58635, aus der Wirkstoffgruppe der NSARs, inhibiert die Cyclooxygenase-2 selektiv

Die enzymatische Wirkung der Cyclooxygenase kann pharmakologisch durch die Gruppe der eingangs erwähnten NSARs inhibiert werden. Immer mehr Untersuchungen wiesen zunächst auf die antitumorigenen Eigenschaften von NSARs, vor allem im kolorektalen Karzinom, hin (60-62). Die Erkenntnisse aus diesen Arbeiten weiteten sich auf andere Tumorentitäten wie Brust-, Prostata- oder Pankreastumoren, sowie das HCC aus (45, 63-67).

NSARs lassen sich in ihrer Wirkungsweise in Bezug auf die Inhibition der Cyclooxygenase in zwei Gruppen unterteilen. Die klassischen NSARs, wie beispielsweise Acetylsalicylsäure (Aspirin®) (Abb. 3A) oder Sulindac, hemmen unspezifisch COX-1 und COX-2. Aufgrund der homöostatischen Wirkung von COX-1 führt ihre Inhibition u.a. zu Störungen der Blutplättchenaggregation oder Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt.

NSARs der neuen Generation inhibieren nun selektiv COX-2 und nur unwesentlich COX-1 (22), was zu einer erheblichen Verringerung der Nebenwirkungen führt. Vertreter dieser Gruppe sind unter anderen SC-58635 (Celecoxib) (Abb. 3B), Meloxicam und NS-398. In einer *Multicenter*-Studie an Arthritispatienten konnte der positive Effekt der selektiven COX-2-Inhibierung an der deutlichen Abnahme der gastrointestinalen Ulzerationen gezeigt werden. Im Vergleich zur Behandlung mit Naproxen, einem nicht spezifischen NSAR, nahm die Inzidenz der Nebenwirkungen mit SC-58635 von 19 % auf 4 % ab (68).

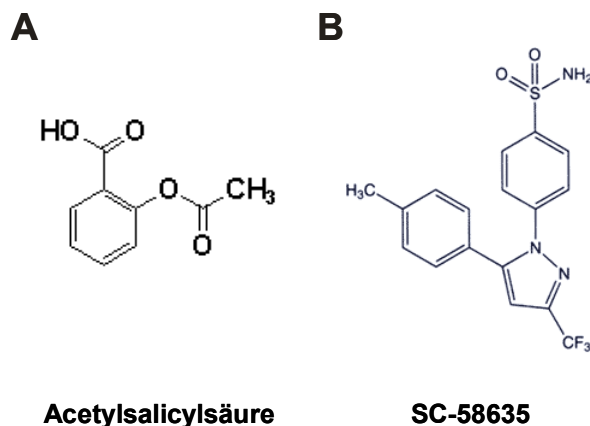


Abb. 3: Strukturformeln von NSARs. A: Acetylsalicylsäure inhibiert COX-1 und COX-2. **B:** SC-58635 hemmt COX-2 spezifischer.

Die antiproliferativen und antineoplastischen Eigenschaften in verschiedenen Tumorentitäten blieben den spezifisch COX-2 inhibierenden NSARs nicht nur erhalten, sondern konnten darüber hinaus verbessert werden (67, 69-72). Untersuchungen in Kolonkarzinomzellen verglichen den selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 mit Indometacin, einem unselektiven COX-2-Inhibitor, wobei beide NSARs dosis-abhängige Effekte in Bezug auf die Inhibierung der Proliferation zeigten. Im Vergleich aber war der spezifische COX-2-Inhibitor NS-398 deutlich effektiver (73, 74). Eine andere Arbeit in Kolonkarzinomzellen belegte die bessere Effektivität der Apoptoseinduktion von SC-58635 im Vergleich zur unspezifischen Inhibition mit Indometacin (75). In Lebertumorzelllinien wurde die Wirkung von spezifischen NSARs auf die Zellvitalität zur Wirkung eines nicht spezifischen NSARs verglichen (45). Dafür wurden die Zelllinien HepG2, SK-Hep-1, HuH-7, Hep3B mit SC-58635 und Meloxicam als spezifische NSARs und Sulindac als nicht spezifisches NSAR behandelt. Die Abnahme der Zellvitalität war bei der spezifischen COX-2-Inhibierung in allen Zelllinien deutlich stärker als bei der unspezifischen Blockade. Darüber hinaus erwies sich die COX-2-Inhibierung mit SC-58635 in HuH-7-Zellen als besonders effizient (45). So wurde die antineoplastische Wirkung der NSARs direkt mit der Inhibierung der COX-2 assoziiert (15, 16).

1.4. Der programmierte Zelltod, die Apoptose

Während der Apoptose führt ein genau definiertes genetisches Programm der Zelle selbst zu ihrem Zelltod. Der Vorgang wurde als erstes von Kerr et al. 1972 beschrieben und nach dem griechischen Ausdruck *αποπτωσης* (altgr. *apoptosis*, "Abfallen") für Laubfall benannt (76). Apoptose ist ein wichtiger Vorgang u.a. bei der Embryonalentwicklung, der Homöostase von mehrzelligen Organismen oder im Immunsystem (77, 78). Viele Krankheiten, wie AIDS (79) oder Krebs sind durch eine fehlgesteuerte Apoptose gekennzeichnet. Man unterscheidet drei Schritte in der Apoptose: Die Initiation, Exekution und Termination. Die Initiation der Apoptose wird durch unterschiedliche Faktoren und Reize, wie UV- oder γ -Bestrahlung, Chemotherapeutika oder endogen, durch das körpereigene Immunsystem, ausgelöst. Hierbei spielen vor allem Todesrezeptoren, aber auch die Inaktivierung von Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle. Bei der Apoptoseexekution invertiert die Zellmembran, wobei die Zelle in kleine Blasen abgeschnürt wird, was auch als *Blebbing* oder *Zeiose* (altgr. *ζειω*, *zeio*, ich koche) bezeichnet wird. Die so gebildeten apoptotischen Körper (*apoptotic bodies*) werden unter dem Mikroskop gut sichtbar. Der Zellkern wird fragmentiert, es kommt zur Chromatinkondensation und in der Folge wird DNA abgebaut, während die Mitochondrien erhalten bleiben. In der Endphase der Apoptose, der Termination, werden die *apoptotic bodies* schließlich phagozytiert (80). Apoptose ist ein aktiver Prozess, der ATP abhängig, unter ATP bereitstellenden Bedingungen in der Zelle, ausgeführt wird (81, 82). Eine andere Form des Zelltodes wird als Nekrose vom altgriechischen Wort *νεκρός* (*nekros*), der Leichnam, bezeichnet und ist pathologisch. Die Nekrose ist ein passiver Vorgang, der selbst kein ATP benötigt und bei niedrigen ATP-Konzentrationen begünstigt wird (81). Die Zellen schwellen an und platzen, dabei werden die Zellorganellen zerstört und intrazelluläre Bestandteile treten nach außen. Dies führt in der Folge zu Entzündungsreaktionen mit weiteren pathologischen Folgen. Bei der Apoptose dagegen entsorgen sich die Zellen selbst, ohne das umliegende Gewebe zu schädigen, wodurch inflammatorische Prozesse vermieden werden können. Vorteilhaft ist auch die Wiederverwendung der bei der Apoptose entstandenen Abbauprodukte in der phagozytierenden Zelle.

1.5. Caspasen leiten als proteolytische Enzyme Apoptosesignale weiter

Caspasen gehören zur Gruppe der Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Sie spalten ihre Zielproteine C-terminal von Aspartat (83). Daher leitet sich ihr Name ab: Cystein **Aspartat** Proteasen. In der Zelle werden die Caspasen als Procaspasen synthetisiert (84) und stehen damit sehr schnell zu deren Verwendung in der Zelle bereit. Die noch inaktiven Caspasen werden durch andere Caspasen in kleinere Untereinheiten gespalten und damit aktiviert (85), wodurch das Apoptosesignal kaskadenartig weitervermittelt wird.

Ihre physiologischen Aufgaben erstrecken sich in der Hauptsache auf die Apoptoseweiterleitung, aber auch auf die Aktivierung von Zytokinen. Dementsprechend können die Caspasen in drei Subfamilien eingeteilt werden: Zytokinaktivatoren (Caspase-1, -4 und -5), Apoptoseinitiatoren (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Apoptoseeffektoren Caspase-7, -3 und -6 (83). Die Initiator-Caspasen stehen am Anfang der Apoptosesignalkette (Abb. 4), dagegen sprechen die Effektoren downstream (Abb. 4) zusätzlich andere Klassen von apoptoserelevanten Zielproteinen an. So ist die Nuklease DFF40/CAD, welche die Fragmentierung der DNA katalysiert, ein Ziel der Caspase-3 (CASP-3) (86, 87). Die CASP-8 spaltet BID, ein Mitglied der BCL-2-Familie, wodurch letztendlich die Mitochondrien aktiviert werden (88) (s. Kap. 1.7.3.). Damit erhält CASP-8

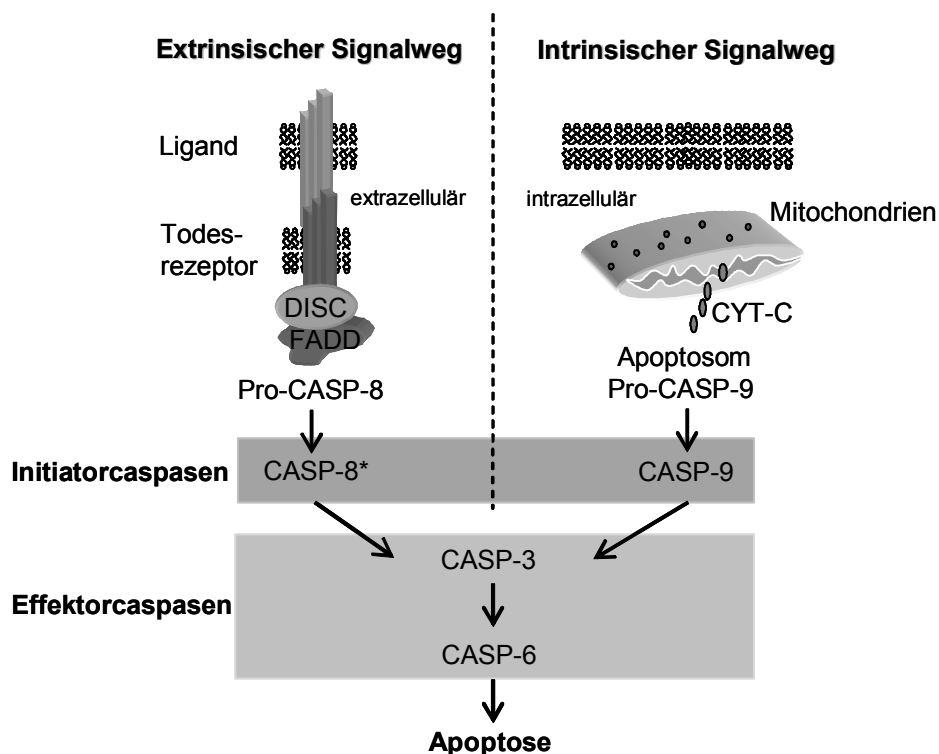


Abb. 4: Schematische Darstellung von Initiator- und Effektorcaspasen. Initiatorcaspasen stehen am Anfang der Signalkaskade. Effektorcaspasen sind *downstream* der Initiatorcaspasen aktiv und sprechen zusätzlich noch weitere Zielproteine an. *Eine Sonderstellung nimmt CASP-8 ein, da sie auch als Effektorcaspase fungieren kann.

als apikale Initiator-Caspase eine Sonderstellung, da sie auch die Aufgabe einer Effektorcaspase übernimmt (Abb. 4).

Die am Anfang der Reaktionskette stehenden Initiatorcaspasen (auch als apikale Caspasen bezeichnet) werden mittels proteolytischer Spaltung, der Hydrolyse von Peptidbindungen, aktiviert. CASP-8 wird auf Höhe der Todesrezeptoren, im extrinsischen Apoptosesignalweg (Abb. 4), über eine Protein-Protein-Interaktion der ProCASP-8 mit dem DISC-Komplex (*death inducing signalling complex*) aktiviert (Abb. 5). Dabei wird ProCASP-8 zuerst oligomerisiert. Aus den Oligomeren wird über eine stabile Interaktion der Proteasedomänen jeweils zwei benachbarten Pro-Caspasen-Dimere gebildet (Abb. 5 I), welche enzymatisch aktiv sind (89-91). Diese Dimere können nun von anderen Dimeren zwischen der großen und der kleinen Untereinheit proteolytisch gespalten werden (Abb. 5 II). In der Folge findet eine Konformationsänderung zwischen der Prodomäne und der großen Untereinheit statt, wodurch die große Untereinheit abgespalten wird (Abb. 5 III). Die so entstandene reife aktive CASP-8 wird ins Zytosol entlassen (92).

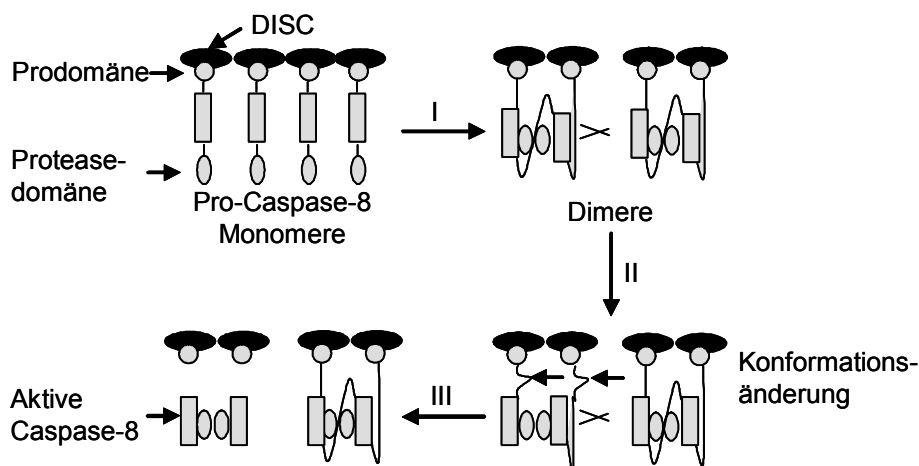


Abb. 5: Modell der Caspase-8-Aktivierung. I: Dimerbildung über eine stabile Interaktion von jeweils zwei benachbarten Pro-Caspasen über ihre Protease-Domänen. II: Die Dimere können andere Dimere in eine große und kleine Untereinheit spalten, wodurch es zur Konformationsänderung zwischen der Prodomäne und der großen Untereinheit kommt. III: In der Folge werden die große Untereinheit und die Prodomäne voneinander gespalten. Die so entstandene reife aktive CASP-8 wird ins Zytosol entlassen. Abbildung nach Chang et al. (92)

Die Procaspase-9 erfährt ihre Aktivierung *downstream* der Mitochondrien am Apoptosom, einem aus Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*)-Heptameren bestehendem Adapterprotein (93). Dieses wiederum bindet sieben Procaspase-9-Dimere, welche im Zusammenwirken mit Cytochrom-c (CYT-C) in die aktiven Untereinheiten der CASP-9 prozessiert werden (93-95).

Einmal aktiviert, entfalten die apikalen Caspasen ihre proteolytische Wirkung auf die nachfolgenden Effektor-Caspasen kaskadenartig. So kommt es zu einer regelrechten, sich selbst verstärkenden, Caspasenkaskade. Dabei überschneiden sich die beiden Reaktionsketten einmal ausgehend von CASP-8 und einmal von CASP-9 bei der Aktivierung der Effektorcaspase-3, welche wiederum *downstream* CASP-6 aktiviert. Aber auch das antiapoptotische MCL-1 (s. Kap. 1.7. und 1.7.1.) kann ein Substrat der CASP-3, welche normalerweise *downstream* der Mitochondrien (Abb. 4) in die Apoptoseexekution eingebunden ist (96), sein.

Ein wichtiger Vorteil der Caspasen liegt in ihrer schnellen Verfügbarkeit, da sie bereits fertig prozessiert als Procaspasen in der Zelle jederzeit abrufbar sind. So konnte in HuH-7-Zellen ein Spaltung der CASP-9, CASP-3 und CASP-6 innerhalb 30 Minuten selektiver COX-2-Blockade mit SC-58635 belegt werden (45). Weiterhin erreichen die Effektor-Caspasen über andersartige Zielproteine andere Zellorte, wie die Mitochondrien oder den Nukleus. Somit sind Caspasen eine der wichtigsten Proteine in der Apoptoseexekution.

1.6. Der intrinsische Apoptosesignalweg führt über die Mitochondrien

Die Mitochondrien sind von zwei jeweils spezialisierten Membranen, der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran, umgeben. Zwischen beiden Membranen befindet sich der Membranzwischenraum, die innere Membran begrenzt die Matrix. Die äußere Membran enthält das Transportprotein Porin, auch VDAC (*voltage-dependent anion channel*) genannt, welches große Kanäle durch die Lipiddoppelschicht bildet (97). Durch diese Kanäle können Moleküle bis zu 5.000 Da oder kleine Proteine in den Membranzwischenraum transportiert werden. Die meisten dieser Moleküle verbleiben im Zwischenraum, da sie die innere Mitochondrienmembran nicht passieren können. Diese ist stark gefaltet und bildet sog. "Cristae" (98, 99). Die zahlreichen Cristae ragen in den Innenraum, die Matrix, hinein. Ein wesentlicher Bestandteil der Innenmembran ist Cardiolipin, ein Phospholipid bestehend aus vier statt zwei Fettsäuren, wodurch vor allem Ionen von der Matrix ferngehalten werden. Außerdem ist die Innenmembran über hoch spezialisierte Transportproteine nur selektiv durchlässig für Stoffwechsellmoleküle oder Substrate der Matrixenzyme (98).

Die Mitochondrien sind nicht nur über die Elektronentransportkette an der Bereitstellung von ATP oder der Biosynthese weniger Stoffwechselproteine beteiligt, sondern auch an der intrinsischen Apoptoseexekution (100). Liu et al. identifizierten das Elektronen übertragende CYT-C als ein entscheidendes zur Apoptose beitragendes Protein, welches vom Membranzwischenraum ins Zytosol austritt (101). Dort trägt es mit Hilfe von ATP oder dATP

(desoxy ATP) zur Oligomerisierung von APAF-1-Heptameren bei, welche wiederum das Apoptosom bilden (93). Im Mitochondrium wurden für CYT-C entsprechend seiner Aufgabe jeweils unterschiedliche Aufenthaltsorte gefunden. Ein Teil des CYT-C, welches nicht direkt an der Elektronentransportkette beteiligt ist, liegt gebunden an Cardiolipin vor (102). Die Voraussetzung für den CYT-C Ausstrom ist die Depolarisierung und Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Gegenwärtig wird der genaue Mechanismus des CYT-C Austritts anhand verschiedener Modelle, welche sich zum Teil auch ergänzen, diskutiert (s. Abb. 6).

Im ersten Modell ist die Aktivierung der proapoptotischen BCL-2-Familienmitglieder BAX (*BCL-2-associated X protein*) und BAK (*BCL-2-antagonist/killer*) Voraussetzung für den CYT-C-Ausstrom. Dafür wurde die Bildung von BAX/BAK-Kanälen in der Außenmembran der Mitochondrien postuliert (s. Kap. 1.7.2.). In der Folge löst sich CYT-C aus seiner Bindung mit Cardiolipin an der Innenmembran und verlässt durch den BAX/BAK-Kanal das Mitochondrium (Abb. 6, Modell 1) (103).

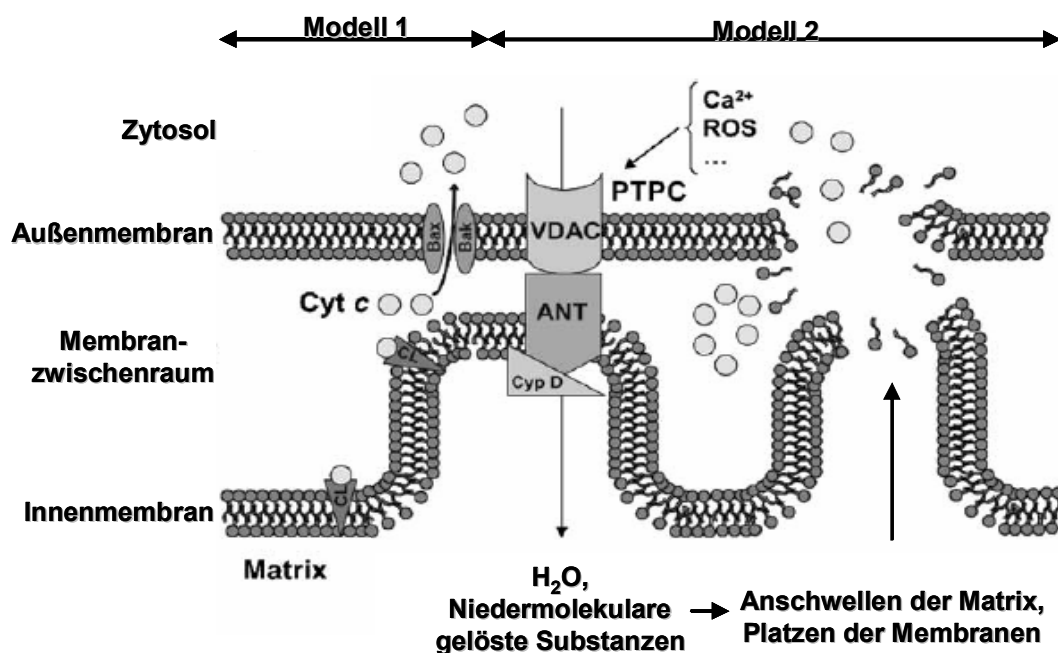


Abb. 6: Modellvorstellungen der Permeabilisierung von Mitochondrienmembranen. Modell 1 geht von der Bildung eines BAX/BAK-Kanals in der äußeren Membran aus. CYT-C löst sich aus der Interaktion mit Cardiolipin (CL) und gelangt über den Kanal ins Zytosol. Im Modell 2 bilden VDAC (*voltage dependent anion channel*) mit ANT (*adenine nucleotide translocator*) und Cyp D (Cyclophilin D) den Membranporenkomplex PTPC (*permeability membrane pore complex*). Dieser erstreckt sich über beide Membranen und den Membranzwischenraum. Bei einer Zunahme von Ca^{2+} oder ROS (*reactive oxygen species*) im Zytosol öffnet sich PTPC für niedermolekulare gelöste Substanzen. In der Folge strömt H_2O in das Mitochondrium nach, bis schließlich durch den zunehmenden osmotischen Druck die Membranen platzen. Der CYT-C-Ausstrom ist die Folge. Abbildung nach Garrido et al. (103).

Eine andere Vorstellung geht von der Bildung des PTPC (*permeability transition pore complex*) (104) aus (Abb. 6, Modell 2). Dieser Komplex besteht aus dem VDAC in der Außenmembran, dem ANT (*adenine nucleotide translocator*) in der Innenmembran und Cyclophilin D (Cyp D) in der Matrix (103, 105). Der Kanal wird bei einer zytosolischen Zunahme von Ca^{2+} und *reactive oxygen species* (ROS) für niedermolekulare gelöste Substanzen geöffnet. In der Folge strömt H_2O osmotisch in die Matrix nach und die Mitochondrien schwellen an. Durch den zunehmenden Druck platzen die Membranen, der CYT-C-Ausstrom ist die Folge (104).

Ergänzend zu den beiden Modellen wurde auch ein Zusammenwirken von BAX und ANT bzw. PTPC berichtet (106). Beide Komponenten waren außerdem nur gemeinsam in der Lage, Kanäle in künstlichen Membranen zu bilden. Aber auch BAX und BAK können zusammen mit PTPC einen Kanal bilden, was durch BCL-2 inhibiert werden konnte (104). Möglicherweise trifft je nach Zellsystem oder dem jeweiligen Apoptosestimulus einmal das eine, einmal das andere Modell oder eine Kombination beider Modelle zu (103).

1.7. Die Proteine der BCL-2-Familie beeinflussen die Mitochondrien in einem komplexen Zusammenspiel

Obwohl sie der gleichen Familie angehören, besitzen die Proteine der BCL-2 (*b-cell-lymphoma-2*)-Familie entweder eine pro- oder antiapoptotische Funktion. Die BCL-2-Familienmitglieder zeichnen sich durch Sequenzhomologien zu vier unterschiedlichen Domänen des BCL-2-Proteins aus. Diese Domänen werden als BH (BCL-2-Protein-Homolog) bezeichnet und in BH1, BH2, BH3 und BH4 unterschieden (Abb. 7).

Die Proteine, die über alle Domänen BH1 bis BH4 verfügen, wirken antiapoptotisch. Dazu gehören z.B. BCL-2, BCL-X_L (*b-cell-lymphoma x long*) und MCL-1 (*myeloid cell leukemia-1*). Sind dagegen nur, wie bei BAX und BAK, die BH1- bis BH3-Domänen ausgebildet, fungieren die Proteine proapoptotisch. Aufgrund ihrer verschiedenen konservierten Sequenzregionen wird diese Gruppe der proapoptotischen Proteine auch als *multidomain proteins* (MDP) bezeichnet (107). Im Gegensatz dazu bildet eine dritte Untergruppe der BCL-2-Proteine die BH3 *only* Proteine (BOP). Sie verfügen nur über die BH3-Domäne als Sequenzhomologie, und wirken gleichfalls proapoptotisch (108). Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise BIM (*bcl-2 interacting mediator of cell death*) und BID (*BH3 interacting domain death agonist*). Die BH3-Domäne wird als Ligand für die

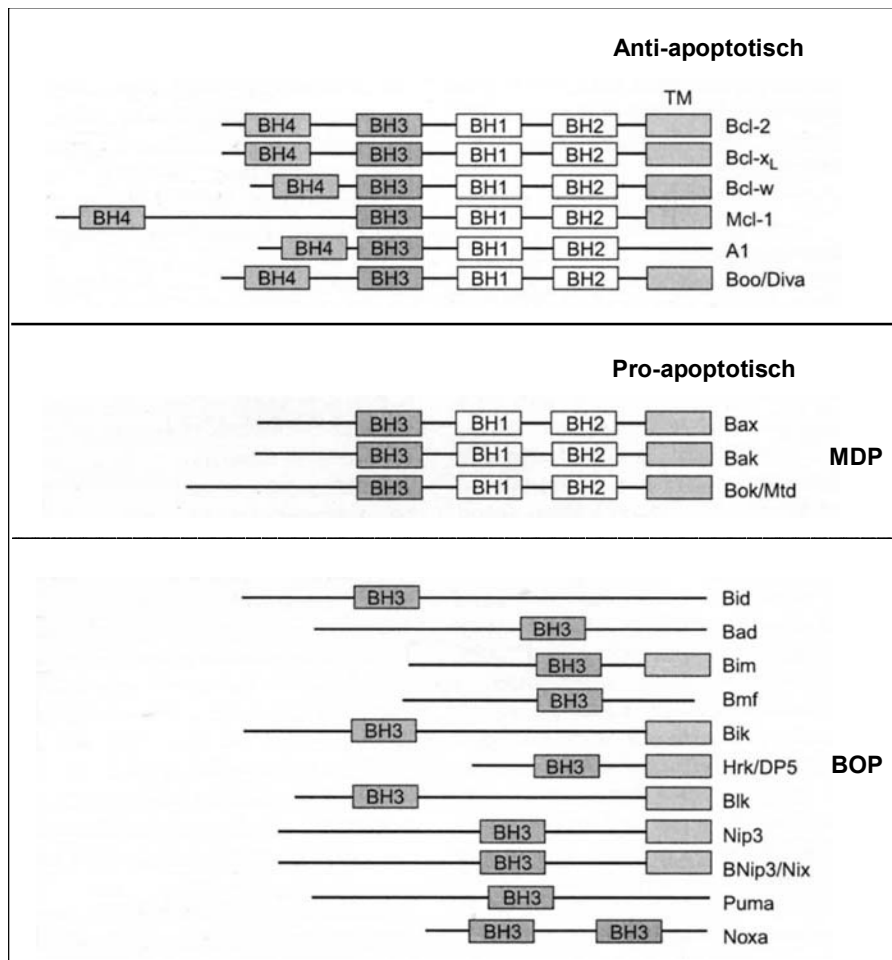


Abb. 7: Schematische Darstellung und Klassifizierung einiger BCL-2-Familienmitglieder. Zu den antiapoptotischen Proteinen werden diejenigen mit den Sequenzhomologien der BH1- bis BH4-Domänen gezählt. Die proapoptotischen BCL-2-Proteine verfügen über die BH3-Domäne, nicht aber über die BH4-Domäne. Sie werden in MDPs, mit BH1- bis BH3-Domäne, und BOPs, nur BH3-Domäne, unterteilt. **TM** Transmembrandomäne, **BH** BCL-2-Homolog, **MDP** multidomain protein, **BOP** BH3 only protein, Abbildung modifiziert nach Kuwana & Newmeyer (109).

Interaktion mit antiapoptotischen BCL-2-Proteinen oder den proapoptotischen MDPs benutzt. Dabei blockieren BOPs vom Typ I die antiapoptotischen Proteine. BOPs vom Typ II wirken sowohl als Antagonisten auf die antiapoptotischen BCL-2-Familienmitglieder, als auch als Agonisten, indem sie die proapoptotische Wirkung der MDPs verstärken (107, 110) (Abb. 8). BCL-2, BCL-X_L, BAX und BAK verfügen außerdem über eine Transmembrandomäne (Abb. 7). Diese ermöglicht BAX und BCL-2 die Interaktion mit Porenproteinen der Mitochondrienmembran. Dabei werden die Poren entweder geöffnet (BAX) oder geschlossen (BCL-2), was im unmittelbaren Zusammenhang mit der Änderung des Membranpotentials ψ stehen könnte (111).

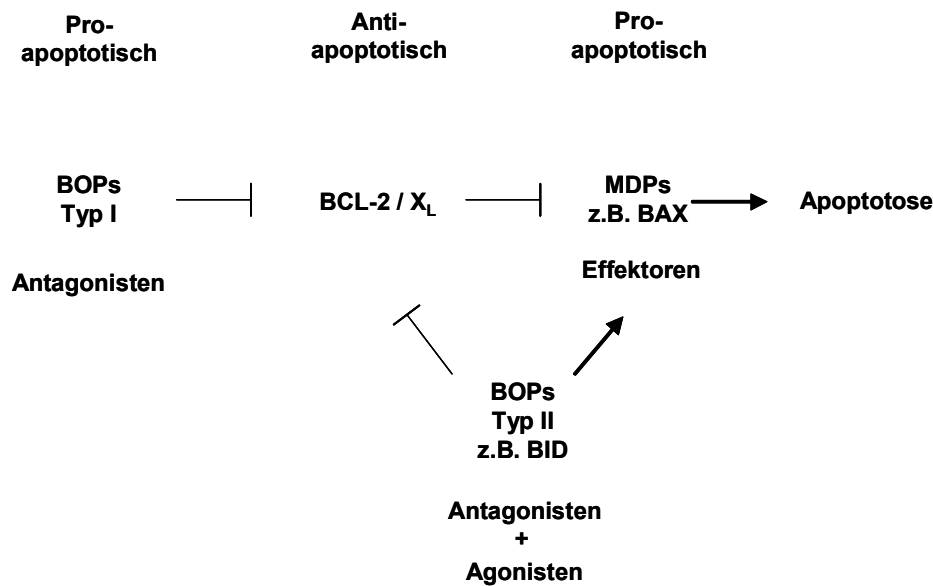


Abb. 8: Funktionsweise der BCL-2 Familienmitglieder. BOPs vom Typ I blockieren die antiapoptotischen Proteine wie z.B. BCL-2. BOPs vom Typ II wirken sowohl als Antagonisten auf die antiapoptotischen Proteine als auch als Agonisten auf die proapoptotischen MDPs. Die antiapoptotischen Familienmitglieder wiederum blockieren die MDPs. **TM**: Transmembrandomäne, **BH**: BCL-2-Homolog, **MDP**: *multidomain protein*, **BOP**: *BH3 only protein*. Abbildung modifiziert nach Reed (107).

Das Zusammenspiel der BCL-2-Proteine ist überaus vielfältig und soll am Beispiel der jeweiligen Vertreter (MCL-1, BAX und BID) aus den drei Untergruppen im Folgenden erläutert werden.

1.7.1. MCL-1, ein antiapoptotischer Vertreter der BCL-2-Familie

Das antiapoptotisch wirkende MCL-1, lokalisiert in den Mitochondrien (112, 113), spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung und Tumorigenese. Dabei hat MCL-1 vor allem eine Schlüsselrolle beim Start des jeweiligen Programms und nimmt weniger Einfluss auf diese Vorgänge selbst (114). Nach Zytokinstimulation wird MCL-1-RNA schnell, d.h. innerhalb einer halben Stunde, hochreguliert und ist innerhalb von einer Stunde auf Proteinebene nachweisbar (115).

Für MCL-1 wurden viele Regulationsebenen beschrieben. Die transkriptionelle Regulierung erfolgt über verschiedene Signalwege. Hierbei spielen unter anderem der MEK/ERK-Weg, der Weg über PI3K/AKT oder auch über JAK/STAT eine wichtige Rolle (114). Speziell im HCC ist die MCL-1-Expression abhängig von PI3K/AKT und ERK (116). MCL-1 kann außerdem über alternatives *Splicing* posttranskriptionell reguliert werden. Hierbei entsteht eine verkürzte Form des MCL-1-Proteins, als MCL-1_{S/ΔTM} oder MCL-1S bezeichnet, das nur noch über die BH3-Domäne verfügt und somit eine proapoptotische Funktion übernimmt

(117, 118). Eine weitere Möglichkeit der Modifizierung und damit Einflussnahme auf die Funktion von MCL-1 geschieht posttranslational über Phosphorylierung (119). Dabei erfüllen verschiedene Phosphorylierungswege unterschiedliche Funktionen, die die antiapoptotische Wirkung von MCL-1 sowohl verstärken als auch abschwächen können. Zuletzt spielt der hohe *turn-over* eine wichtige Rolle in der Regulierung von MCL-1. Dabei wird das Protein mit einer Halbwertszeit von einer halben Stunde bis drei Stunden abgebaut (113, 120). Entscheidend für den schnellen Proteinabbau sind sog. PEST-Sequenzen. Dies sind Proteinsequenzen bestehend aus zwölf oder mehr Aminosäuren, welche mindestens ein Prolin (P), ein Glutamat (E) oder Aspartat sowie ein Serin (S) oder Threonin (T) enthalten.

Bemerkenswert ist die Fähigkeit von MCL-1 zur Gegenregulierung, wenn Apoptose stimulierende Reize auf die Zellen einwirken. Dadurch wird zunächst die Zellvitalität gefördert. Erst in einem zweiten Schritt, wenn der Apoptose-Reiz weiter auf die Zelle einwirkt, entscheidet sich das weitere Zellschicksal (121-123). So fördern zytotoxische Stimulantien, wie z.B. Colchizin oder Etoposid, zunächst die Induktion von MCL-1. (121, 124, 125) . Auch nach Bestrahlung kommt es zu einem raschen Anstieg (vier Stunden) der MCL-1-mRNA in ML-1-Zellen (126).

Auf Proteinebene liegt MCL-1 gebunden in einem inaktiven Proteinkomplex mit proapoptotischem BAK vor, welches mit seiner BH3-Domäne mit hoher Affinität an MCL-1 bindet (122, 127). Bei Stimulierung mit apoptoseauslösenden Reizen wird MCL-1 proteasomal abgebaut und dadurch BAK aus der Bindung mit MCL-1 herausgelöst (122, 123). Dabei ist die Zerstörung des BAK-MCL-1-Komplexes abhängig von mitochondrialem p53 (128). Durch die Herauslösung von BAK kann MCL-1 wiederum leichter über Ubiquitinierung abgebaut werden. (122). MCL-1 kann auch als Substrat der CASP-3 proteolytisch gespalten werden (129-132). Durch die proteolytische Spaltung verliert MCL-1 seine antiapoptotische Funktion und wird proapoptotisch. Über die CYT-C-Freisetzung entsteht eine positive Rückkopplung (*feedback loop*), indem CASP-9 gespalten wird, welches wiederum CASP-3 aktiviert, deren Substrat MCL-1 ist (129).

1.7.2. BAX öffnet die Poren der Mitochondrienmembran

BAX liegt in lebenden Zellen als inaktives Monomer im Zytoplasma oder locker an Membranen gebunden vor. Durch apoptotische Signale wie z.B. Caspasenspaltung oder dem Einfluss von p53 (133) erfährt es eine Konformationsänderung. Dadurch wird die BH3-Domäne in eine exponierte Lage gebracht, was zur Bildung von Homodimeren führt. Diese stabilisieren das Protein gegenüber dem Abbau von Ubiquitin und translozieren an das Mitochondrium (134, 135). Dort binden BH3 *only* Proteine wie z.B. BID direkt an BAX und induziert dessen Oligomerisierung (136). Als homooligomerisiertes Multimer dringt es dann in die äußere Mitochondrienmembran ein, wodurch in der Folge Poren geöffnet werden (108, 137). BAX ist aber auch in der Lage in direkter Interaktion mit VDAC diesen Kanal zu öffnen (138). Für sehr viele Zell- und Apoptosesysteme ist die Aktivierung von BAX eine entscheidende Voraussetzung zur Apoptoseexekution über die Mitochondrien. Beispielsweise waren BAX defiziente Prostata- und Kolonkarzinomzellen deutlich weniger sensitiv für die Ceramid induzierte Apoptose als Wildtypzellen (139). Häufig wird BAX gemeinsam mit BAK aktiviert. So waren BAX und BAK defiziente MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*) hoch apoptoseresistent, während das Fehlen nur eines Proteins zu einer höheren Apoptose führte (140, 141).

Die proapoptotische Wirkung von BAX wird über die Heterodimerisierung mit BCL-2 blockiert. Die Bindung von BAX an BCL-2 und die Bildung von stabilen BCL-2-Homodimeren kann blockiert werden, wenn das BAX-BCL-2-Verhältnis zugunsten von BAX verschoben wird. Dies wird beispielsweise mit Hilfe der Überexpression von BAX, induziert durch den Transkriptionsfaktor p53, erreicht (142, 143).

1.7.3. BID nimmt eine Sonderstellung als Vermittler zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg ein

BID, den BH3 *only* Proteinen zugehörig und proapoptotisch, ist in vitalen Zellen im Zytoplasma lokalisiert. Dort dient es als Substrat der CASP-8 (144), welche am DISC-Komplex der Todesrezeptoren aktiviert wird. Seine Wirkung jedoch entfaltet BID an den Mitochondrien. Bei der proteolytischen Spaltung durch CASP-8 entsteht eine kleinere Untereinheit von BID, *truncated* BID (tBID), welche 15 kDa schwer ist. In der Folge transloziert tBID an die Mitochondrien und aktiviert dort BAX (88, 145). Dies geschieht über die Bindung der BH3-Domäne von tBID an BAX, wodurch BAX oligomerisiert wird, eine Voraussetzung zur Öffnung der Membranporen (146-148).

Somit stellt BID ein Bindeglied zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg dar. Wird die Expression von BID blockiert, kann das Apoptosesignal, von den Todesrezeptoren kommend, nicht mehr an die Mitochondrien weitergeleitet werden. Die extrinsisch induzierten Apoptosesysteme, die von der Aktivierung der Mitochondrien abhängig sind, werden somit resistent. So waren BID defiziente MEF-Zellen gegenüber TNF α induzierter Apoptose und BID defiziente murine Thymozyten gegenüber CD95-Ligand vermittelter Apoptose resistent. Außerdem war diese Resistenz mit einer verminderten Depolarisation der Mitochondrienmembran verbunden (149).

1.8. Die Todesrezeptoren vermitteln mit ihren korrespondierenden Liganden die Apoptose extrinsisch

Über die Todesrezeptoren wird Apoptose auf einem extrinsischen Weg weitergeleitet. Die ganze Gruppe der Todesrezeptoren gehört zur TNF/*neuronal growth factor* (NGF)-Rezeptor Superfamilie. Das kennzeichnende Merkmal dieser Rezeptoren sind extrazelluläre Proteinsequenzen, die zwei bis fünf Wiederholungssequenzen, sog. *repeats*, mit einem hohen Cysteinanteil enthalten. Intrazellulär verfügen sie über eine Todesdomäne (DD, *death domain*), eine Sequenz aus ca. 80 Aminosäureresten, die zur Protein-Protein-Interaktion fähig ist (150). Die Familie der korrespondierenden Liganden hat sich entsprechend in einer Ko-Evolution mit den Rezeptoren entwickelt. Sie wird auch als TNF-Familie bezeichnet. Die meisten Liganden können sowohl in löslicher Form als auch membrangebunden auftreten. Normalerweise sind die Todesrezeptoren in der Mehrzahl nicht membranständig sondern im System des Golgi-Apparates internalisiert. Dies wurde für *cluster of differentiation receptor 95* (CD95), auch unter dem Namen APO1- oder FAS-Rezeptor bekannt, (151, 152), *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) *receptor* 1 und 2 (R1 und 2) (153, 154) und TNF (155) gezeigt. Erst wenn die Rezeptoren aktiviert werden, z.B. durch das Eintreffen eines Apoptosesignals, translozieren sie vom Golgi-Apparat zur Zellmembran. Der Vorgang wird in der Literatur auch als *trafficking* bezeichnet.

Werden die Todesrezeptoren durch die Anlagerung ihrer entsprechenden Liganden angesprochen, werden Adapterproteine an die Todesdomäne rekrutiert. Gemeinsam bilden die Adaptermoleküle einen Komplex, der das Apoptosesignal letztendlich über die Spaltung von CASP-8 weiterleitet. Es werden abhängig von den Rezeptoren zwei Komplexsysteme unterschieden: CD95 und TRAIL-R1 und -R2 bilden die eine Gruppe (s. Kap. 1.8.2.), TNF-Rezeptor 1 und 2, *death receptor* (DR) 2, DR6 und Ectodysplasmin-Rezeptor (EDAR) eine weitere (156) (s. Kap. 1.8.3.).

1.8.1. Die Signalvermittlung an die Todesrezeptoren erfolgt parakrin und autokrin

Der extrinsische Signalweg wird normalerweise durch die Lymphozyten des Immunsystems vermittelt. So induzieren beispielsweise T-Lymphozyten über die Anlagerung ihrer Liganden an die entsprechenden Todesrezeptoren der Zielzellen, z.B. Tumorzellen, Apoptose. Die Zellkommunikation findet dabei entweder über membranständige Liganden, also kontaktabhängig, statt, oder über lösliche Liganden (Zytokine). Diese extrazellulären Signalproteine induzieren Apoptose parakrin, d.h. sie erreichen innerhalb einer kurzen Distanz die Zielzellen eines anderen Zelltyps.

Innerhalb der parakrinen Signalvermittlung wurde aber auch der umgekehrte Fall beschrieben. Demnach exprimieren auch Krebszellen Liganden, welche sich nun ihrerseits an die Zellen der Immunabwehr anlagern, was z.B. die Apoptose von T-Zellen auslöst. Mit Hilfe dieses Gegenangriffs schwächen Krebszellen das Immunsystem sehr zielgenau und verbessern somit deutlich ihr eigenes Überleben. O'Connell et al. beschrieben diesen Effekt für maligne Kolonzellen. Diese exprimierten den Liganden selbst, womit sie *in vitro* Jurkat Zellen, humane maligne T-Lymphozyten, angreifen konnten (157). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für Melanomzellen beschrieben. Indem der Tumor die Immunzellen attackierte, hatte er selbst eine bessere Chance zur Proliferation (158). Dieses Phänomen schließt die Möglichkeit ein, dass Tumorzellen selbst Liganden für Todesrezeptoren exprimieren.

Von Friesen *et al.* wurde die Möglichkeit der autokrinen Signalvermittlung beschrieben (159). Dabei sprechen die Liganden entweder die gleiche Zelle an oder Zellen des gleichen Zelltyps. Dies ist für Untersuchungen interessant, in denen Monokulturen von Tumorzellen auf ihre extrinsische Apoptosesignalvermittlung hin *in vitro* getestet werden. So wurde in einer reinen Kultur von Hepatomzellen der extrinsische Signalweg über CD95 beschrieben (160). Dieser wurde durch Bleomycin, ein Wirkstoff aus der Chemotherapie, induziert. Dabei exprimierten die Tumorzellen *in vitro* verstärkt sowohl den CD95-Rezeptor als auch den CD95-Liganden. Tietze und Kollegen publizierten ebenfalls die Hochregulierung dieses Rezeptorsystems durch das Chemotherapeutikum Adriamycin (Doxorubicin) in HepG2- und HuH-7-Zellen (29). Die Hochregulierung des Rezeptor-Liganden-Systems von CD95 wurde in Hepatomzellen auch nach oxydativem Stress berichtet (161). In Neuroblastomzellen wurde gleichfalls nach Behandlung mit Doxorubicin und Cisplatin das CD95-System aktiviert (162).

1.8.2. Charakteristika der CD95 und TRAIL vermittelten Apoptose

CD95 und TRAIL-R1 und -R2 zeichnen sich durch die Bildung des DISC-Komplexes an den zytoplasmatisch gelegenen DDs der Todesrezeptoren aus (150) (Abb. 9). Bei der Anlagerung ihrer korrespondierenden Liganden werden die Rezeptoren zunächst oligo- bzw. trimerisiert (163, 164). Neben den dadurch gebildeten trimerisierten DDs der Rezeptoren sind die wichtigsten Komponenten des DISC-Komplexes folgende Adapterproteine: FAS *associated via death domain* (FADD) (165), FLICE *like inhibitory protein* *Long/Short* (FLIP_{L/S}), Pro-CASP-10 und Pro-CASP-8. Die Komplexbildung ist für die Weiterleitung des Apoptosesignals entscheidend. Eine herausragende Bedeutung kommt dabei der CASP-8 zu. Durch die DISC-Bildung resultiert eine Protein-Protein-Interaktion von FADD mit Pro-CASP-8, wodurch proteolytisch aktive Procasp-8-Dimere gebildet werden (92, 156). In der Folge wird CASP-8 autoproteolytisch gespalten und auf diese Weise das Apoptosesignal weitergeleitet. Durch die Aktivierung der CASP-8 wird im Anschluss der CD95-Rezeptor internalisiert (166), möglicherweise um Nachbarzellen vor Apoptose zu schützen oder aber um die DISC-Formierung weiter voranzutreiben (150).

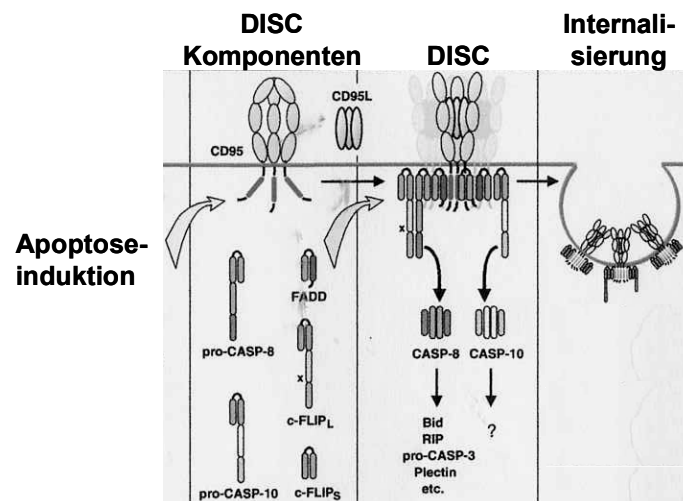


Abb. 9: DISC-Bildung am CD95-Rezeptor. Wird der CD95-Rezeptor durch Apoptosesignale angesprochen, bildet er zunächst Homotrimerie, wodurch die Anlagerung der ebenfalls trimerisierten Liganden an die Rezeptoren möglich ist. Die Komplexbildung erfolgt zusammen mit den Adapterproteinen FADD, FLIP_{L/S}, Pro-CASP-10 und Pro-CASP-8. Durch die Aktivierung der CASP-8 wird im Anschluss der CD95-Rezeptor internalisiert. Abbildung nach Peter und Kramer (150)

1.8.2.1. Der CD95-Rezeptor leitet je nach Zelltyp zwei unterschiedliche Signalwege ein

Bei der Apoptose über CD95 können zwei Zelltypen, Typ I und Typ II unterschieden werden (167). In Zellen vom Typ I, wie beispielsweise SKW (B-Lymphozyten)- und H9 (T-Lymphozyten)-Zellen, wird eine große Menge CASP-8 autoproteolytisch, durch die Aktivierung des DISC-Komplexes, gespalten. Im Anschluss wird *downstream* die direkte Aktivierung der CASP-3 bevorzugt und die Mitochondrien nur zu einem geringen Teil in den Signalweg eingebunden. Dementsprechend kann in Typ I-Zellen die Apoptose auch unabhängig von der Aktivierung der Mitochondrien statt finden.

Dagegen liegt der Schwerpunkt der Apoptoseaktivierung bei Typ II-Zellen, wie Jurkat- und CEM (Lymphoblasten)-Zellen, in der Aktivierung der Mitochondrien. Hierfür reicht eine geringere Aktivität des DISC-Komplexes und damit eine geringere Menge CASP-8 aus. CASP-8 wiederum spaltet BID, welches das Apoptosesignal durch seine Translokation an die Mitochondrien weiterleitet. In der Folge davon tritt eine starke Aktivierung der *downstream* der Mitochondrien gelegenen Caspasen nach der CYT-C-Freisetzung auf (167).

1.8.3. TNF-Rezeptor vermittelte Apoptose

Die Apoptose über den TNF-Rezeptor unterscheidet sich von der CD95/TRAIL-Apoptose, mit deren DISC-Bildung, grundlegend. Innerhalb der Todesrezeptoren nimmt der TNF-Rezeptor eine Sonderstellung ein, da er in erster Linie proinflammatorische Signale vermittelt, aber auch apoptotische Signale weiterleitet (168). Erst die Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF_κB) und dessen Signalweg ermöglicht dem TNF-Rezeptor die Ausübung seiner apoptotischen Funktion (169-171) (Abb. 10).

Analog zu den CD95- und TRAIL-Rezeptor-Ligand-Systemen wird sowohl der TNF-Ligand als auch sein korrespondierender Rezeptor homotrimerisiert. Vorzugsweise bindet dabei der lösliche Ligand an den TNF-R1 und der membranständige Ligand an TNF-R2, aber auch die umgekehrte Bindung ist möglich (168). Bei Anlagerung des TNF-Liganden an den Rezeptor 1 bilden diese zusammen mit anderen Faktoren den Komplex I an der Zellmembran (Abb. 10). Dazu gehören *receptor interacting protein* (RIP), *TNF receptor (R)1-associated death domain* (TRADD) und der *TNFR associated factor* (TRAF).

Unmittelbar danach wird der Komplex modifiziert und durch Endozytose internalisiert. Jetzt transloziert dieser Komplex weg von der Membran ins Zytosol, wo er zusammen mit

ProCASP-8 und -10, sowie FADD und FLIP_{L/S} einen neuen Komplex II, das sog. "TRADDosom" (156) bildet (Abb. 10). Erst dieser Komplex ermöglicht die Aktivierung der CASP-8. Statt der Komplex II-Bildung kann über den Komplex I mittels Aktivierung des NFκB-Weges eine antiapoptotische Richtung eingeschlagen werden (Abb. 10). Dafür wird bei der Bildung des Komplex II FLIP_L, ein Inhibitor für CASP-8, rekrutiert. Eine Voraussetzung, damit die Apoptoseexekution stattfinden kann, ist also die Mutation bzw. Inhibition von NFκB (172). So war in den Hepatomzellen HepG2 und HuH-7 die Apoptose durch TNFα nur möglich, wenn NFκB blockiert wurde. Um dieses Ziel zu erreichen, wird sehr häufig Cycloheximid eingesetzt (29, 30, 173).

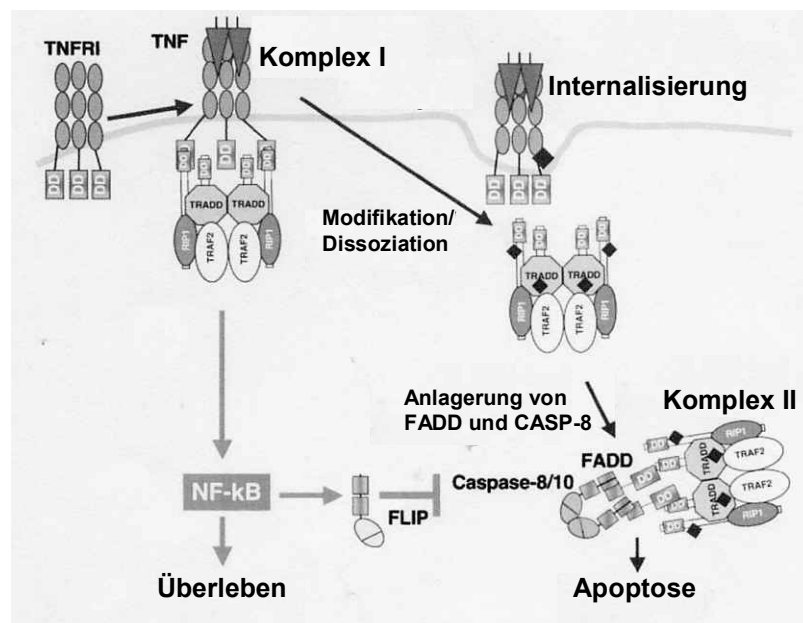


Abb. 10: Die TNF-R1 mediierte Apoptose erfolgt über die Bildung von Komplex I und Komplex II. Analog zu CD95 und TRAIL werden Rezeptor und Ligand zunächst trimerisiert. Nach Anlagerung des TNF-Liganden bildet sich der Komplex I gemeinsam mit TRADD, RIP1 und TRAF2 an der Membran. Nun sind zwei Möglichkeiten offen: das Überleben der Zelle, wenn NF_κB von Komplex I aktiviert wird, oder die Apoptoseexekution mit Bildung des Komplex II. Im letzten Fall werden TNF-R1, TRADD und RIP1 modifiziert (sichtbar als schwarze Raute), wodurch die Verbindungen an den DDs getrennt werden. Der Rezeptor verbleibt an der Membran, wo er internalisiert wird, der andere Teil des Komplex I mit TRADD, RIP1 und TRAF2 wandert in Zytosol. Dort bildet sich durch die Anlagerung von FADD über die DDs, CASP-8 und CASP-10 der Komplex II. Über die Spaltung der CASP-8 wird das Apoptosesignal weitergeleitet. Abbildung nach Micheau und Tschopp (172)

1.9. p53 ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen

Das p53-Gen, benannt nach dem Molekülgewicht des codierten Proteins, ist das wichtigste bekannte Tumorsuppressorgen. In ca. 50 % der Tumoren wird p53 blockiert, nicht aktiviert, oder ist mutiert, was im konkreten Fall eine schlechtere Prognose für Tumorpatienten bedeutet (174, 175). Tumorsuppressorgene können im Bedarfsfall, z.B. bei DNA-Schädigung, den Zellzyklus stoppen, die Replikation und damit die Zellteilung blockieren, aber auch direkt den gerichteten Zelltod (Apoptose) einleiten. Ist die Funktion von p53 gestört, wachsen geschädigte Zellen unkontrolliert weiter. P53 zählt innerhalb der Transkriptionsfaktoren zu der Gruppe der Genregulatorproteine, die mit Hilfe entsprechender Struktur motive direkt an die DNA binden und damit DNA-Sequenzen ablesen können. Diese Struktur motive sind unter anderem aus α -Helices bestehende Helix-Turn-Helix-Motive, die zu den einfachsten und häufigsten DNA bindenden Motiven zählen. Das Zinkfinger-Motiv besteht nicht nur aus Aminosäuren in der α -Helix-Struktur, sondern besitzt ein oder mehrere Zinkionen als Strukturkomponente. β -Faltblattstrukturen können ebenfalls DNA erkennen. P53 verfügt über eine Reihe für Genregulatorproteine typischer Strukturkomponenten wie β -Faltblatt- und Zinkfingermotiv, mit denen es direkt an die DNA bindet (176). Die Oligomerisierung des Proteins zu einem stabilen Tetramer ist ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von p53. Zwei p53-Monomere lagern sich zunächst antiparallel mit je einem β -Faltblatt und der α -Helix-Domäne zu einem Dimer zusammen. Zwei Dimere schließen sich zu einem Tetramer, indem sie sich nun parallel über die Tetramerisierungsdomänen der β -Faltblatt und α -Helix-Struktur zusammenlagern (177, 178).

Interessanterweise aktiviert p53 als Transkriptionsfaktor sein sich inhibierendes und degradierendes Protein MDM2 (*mouse double minute clone 2*) in einem autoregulatorischen *Feedbackloop* (179). Synthetisiertes MDM2 bindet an p53, wodurch p53 ubiquitiniert und anschließend proteolysiert wird. Die p53-Konzentration nimmt dadurch ab, wodurch weniger mdm2-Gen abgelesen und transkribiert wird. Weniger MDM2-Protein erlaubt nun wiederum die Anreicherung von p53. Der Kreis schließt sich, wenn ausreichend p53 vorhanden ist, das die Transkription von mdm2 verhindert.

Normalerweise ist p53 in der Zelle inaktiv und wird, wenn die Zellen gestresst oder geschädigt werden, über unterschiedliche Signalwege aktiviert. Je nach Art der Schädigung bzw. des stressauslösenden Ereignisses wird p53 in hohen Konzentrationen stabilisiert, wodurch es zum Zellzyklusarrest kommt oder Apoptose eingeleitet wird (180). Neben der Tetramerbildung tragen eine Reihe weiterer Modifizierungen wie (De-) Phosphorylierung,

(De-) Acetylierung und (De-) Ubiquitinierung (181) von p53 wesentlich zur Stabilisierung des Proteins bei. Da p53 an zentraler Stelle wichtige Signalwege zusammenführt, welche von dort weiter gesteuert werden, wird es aufgrund seiner zentralen Position auch als "Wächter des Genoms" (182) bezeichnet.

P53 medierte Apoptose nimmt Einfluss auf die Todesrezeptoren wie CD95 (FAS) und TRAIL. So blockiert inaktives p53 die Hochregulierung von CD95 (183), aktives p53 transaktiviert den TRAIL-Rezeptor (184). Aufgrund seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ist p53 im Nukleus lokalisiert. Dort dient es der Regulation einer Reihe von proapoptischen Genen, wie noxa (lat. "Schaden"), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (puma) und – wie für das Osteosarkom gezeigt wurde – apaf-1 (185). Auch das proapoptische, zur BCL-2-Familie gehörende humane bax-Gen besitzt eine Bindungsdomäne für p53 (186). In wenigen bekannten Fällen wurde p53 außerhalb des Zellkerns bei Apoptoseinduktion gefunden, indem es durch Translokation an die Mitochondrien direkten Einfluss dort ausübt (187, 188). Yamaguchi et al. berichteten außerdem über die von p53 beeinflusste Konformationsänderung von BAX im Zytoplasma bzw. infolge der BAX-Translokation im Mitochondrium (133).

1.10. Der Einsatz von Chemotherapeutika – eine klinische Anwendung der Apoptose

Chemotherapeutika werden je nach ihrem Wirkmechanismus in unterschiedliche Klassen, wie z.B. Antimetaboliten, DNA-Polymerase-Inhibitoren, Topoisomerase-Inhibitoren, eingeteilt. Zu den Antimetaboliten zählen Pyrimidin-Antagonisten (z.B. Fluorouracil) und Folsäure-Antagonisten (z.B. Methotrexat). Eine weitere Gruppe greift die DNA über Alkylierung (Mitomycin, Cisplatin, Cyclophosphamid) oder Interkalation (z.B. Mitoxantron, Doxorubicin) an. Andere inhibieren die DNA-Polymerase (z.B. Bleomycin) oder die Topoisomerase II (z.B. Etoposid) (189). Die Folge ist neben den aufgezählten zytostatischen Funktionen zumeist Apoptose (190), welche über das CD95-System in Abhängigkeit von Wildtyp p53 (WTp53) vermittelt wird (159, 160, 162, 189, 191). Obwohl Krebszellen genetisch instabil sind und sich durch hohe Teilungsraten auszeichnen, können sie in der Regel durch Zytostatika nicht selektiv angegriffen werden. Die daraus resultierenden Wirkungen in gesunden Zellen belasten die Patienten durch erhebliche Nebenwirkungen. Ein weiterer erheblicher Nachteil der Chemotherapie ist die Resistenz vieler Krebsarten gegen die induzierte Apoptose (13), die ja entgegen der Natur der entarteten Zelle gerichtet ist. Auch im HCC, respektive in Hepatomzelllinien, ist eine Resistenz gegen Chemotherapeutika bekannt (29, 116, 192-195).

Die molekularen Grundlagen der Apoptoseresistenz sind längst nicht alle aufgedeckt, einige aber bekannt, welche auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Hierzu zählen unter anderem p53-Mutationen (s.o.), eine verstärkte COX-2-Expression (59, 196-198) oder die Erhöhung der MCL-1-Expression (116), welche wiederum eine Folge eines hohen COX-2-Status sein kann (196, 199).

1.11. Beschreibung der ausgewählten Zelllinien

Stellvertretend für das HCC wurden die Experimente der vorliegenden Arbeit an den zwei HCC-Zelllinien HepG2 (200) und HUH-7 (201) durchgeführt. Diese Zelllinien sind aufgrund ihrer hohen COX-2-Expression (45) gut geeignet für Experimente zur Inhibition der COX-2 und deren Auswirkungen auf das apoptotische Geschehen in den Zellen. Dagegen unterscheiden sich HuH-7- und HepG2-Zellen in ihrem p53-Status erheblich: Während HepG2-Zellen über WTp53 verfügen, wurde in HuH-7-Zellen eine Punktmutation in Codon 220 (Exon-6), wodurch Tyrosin durch Cystein ersetzt wird (202), beschrieben (203). Da Exon 6 in der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (176) liegt, verliert das mutierte p53 seine DNA-Bindungseigenschaften (176) und damit eine wichtige Funktion seiner Tumorsuppressorwirkung. Trotzdem befindet sich der p53-Status auf hohem Niveau aufgrund einer erhöhten Halbwertszeit des Abbaus von p53, welche wiederum als Folge der genannten Mutation angesehen werden kann (55, 203). Von anderen Karzinomarten wie z.B. den squamösen Kopf- und Halskarzinomen (HNSCCs) ist ebenfalls eine Korrelation von mutiertem p53 und erhöhtem COX-2-Status bekannt (204). Der Gehalt von wildtypisch transkriptionell aktivem p53 in HepG2-Zellen wurde dagegen als gering beschrieben (160).

1.12. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der in Frage kommenden apoptotischen Signalwege nach spezifischer COX-2-Inhibition im HCC. Mit Hilfe dieser Kenntnisse sollte eine möglichst effektive Therapiemöglichkeit für das HCC in Kombination mit NSARs herausgearbeitet werden können. Stellvertretend für das HCC wurden die Arbeiten an aus HCC generierten Hepatomzelllinien HepG2 und HuH-7 mit unterschiedlichem p53-Status (WT und mutiert) zum Vergleich durchgeführt. Als spezifischer COX-2-Inhibitor wurde das NSAR, SC-58635, verwendet. Dabei wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

Die Charakterisierung der Apoptoseexekution im HCC nach selektiver COX-2-Blockade. Dabei sollte die Zellvitalität, die spezifische Apoptose und die funktionelle Beteiligung der Caspasen berücksichtigt werden.

Die Darstellung der intrinsischen – über die Mitochondrien vermittelten – Apoptose. Hierbei sollten zuerst allgemeine Charakteristika einer mitochondrial vermittelten Apoptose, wie die Depolarisierung der Mitochondrienmembran und die Freisetzung von CYT-C ermittelt werden. Des Weiteren lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Aktivierung der Mitochondrien aufgrund der Mitwirkung von Mitgliedern der BCL-2-Familie.

Die Untersuchung der extrinsischen Apoptose über die Todesrezeptoren. Zunächst sollte eine Beteiligung des extrinsischen Signalweges über die Abhängigkeit der Apoptose von FADD, dem Adapterprotein für den DISC-Komplex und Komplex II, geklärt werden. Weitere Analysen zur Expression der Todesrezeptoren an der Zelloberfläche und zur Sensitivierung der Rezeptorsysteme durch SC-58635 sollten die Beteiligung von CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 und -R2 nach selektiver COX-2-Blockade klären.

Die Beschreibung von apoptotischen Effekten in den Hepatomzellen bei der Kombination von SC-58635 mit herkömmlichen Chemotherapeutika. Hierbei war von besonderem Interesse, ob in der Kombination mit SC-58635 die Dosis von Chemotherapeutika reduziert werden kann. Weiterhin sollte im Vergleich mit primären Hepatozyten (PHH) getestet werden, ob diese Behandlung selektiv für die Hepatomzellen ist. Weiterhin sollte die Beteiligung des extrinsischen Signalweges während der Kombinationsbehandlung untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Bioreagenzien, *Kits*

Acrylamid 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ameisensäure 85%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bleomycin	Cell Pharm GmbH, Hannover
Caspase 3-Inhibitor II, Z-DEVD-FMK	Calbiochem GmbH, Darmstadt
Caspase 8- Inhibitor II, Z-IETD-FMK	Calbiochem GmbH, Darmstadt
Caspase 9-Inhibitor I, Z-LEHD-FMK	Calbiochem GmbH, Darmstadt
Caspase-3 Fluorometric Assay	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
Caspase-8 Fluorometric Assay	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
Caspase-9 Fluorometric Assay	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
CHAPS 10x	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Chemiluminescence Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DAB Kit / POX	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DiOC ₆ (3)	Molecular Probes, Eugene, OR
DMEM Grundmedium (4,5 g/l Glukose)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Doxorubicin	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
DTT 200x	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gentamycin (10 mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glykogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ham F12	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HBSS Salzlösung gepuffert	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Heparin (5.000 U/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hepes Puffer 1M	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Histoacryl W Gewebekleber	B. Braun AG, Melsungen
Hydro-Cortison (4,85 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hydrogenperoxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Insulin (Zn ²⁺ -Komplex)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
JC-1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kollagen R, Typ I	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Mayer's Hämalau	Merck KGaA, Darmstadt
MEM Grundmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MgCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mitoxantron	Wyeth Pharma GmbH, Münster
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natrium Citrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pan-Caspase-Inhibitor, Z-VAD-FMK	Bachem GmbH, Weil am Rhein
PBS Dulbecco's	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR Puffer 10x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin G (10.000 U/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Penicillin G 10.000 U/ml-Streptomycin 10 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PGE ₂	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BC Assay zur Proteinbestimmung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Proteinase Inhibitor Cocktail (SPI) 100x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteinase Inhibitor Cocktail 50x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase Inhibitor Cocktail 50x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
RPMI-1640 Grundmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SC-58635 (Celebrex®)	Pfizer, New York, USA
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Streptomycin 10 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TransFectin	BioRad, Hercules, CA, USA
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TWEEN 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Williams-Medium E	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.2. Immunreagenzien, Proteine, Inhibitoren

anti-Apo-1, IgG3, k-Antikörper, monoklonal	freundliche Gabe Dr. H.P. Krammer, DKFZ Heidelberg
anti-p53 (DO-1)-Antikörper	BD Biosciences, PharMingen, Heidelberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BAX Antikörper	Cell Signaling Technology, Beverly, MA USA
BID Antikörper	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA, USA
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CASP-8 Antikörper	freundliche Gabe von Labor P. Krammer, DKFZ Heidelberg
COX-2 Antikörper für Immunzytologie	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
COX-2 Antikörper für Western-Blotanalyse	BD Transduction Laboratories™, Heidelberg
CYT-C Antikörper	BD Transduction Laboratories™, Heidelberg
Cytochrom-c Oxidase Antikörper	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DDT 200x	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
goat-F(ab) ₂ - anti-mouse-Biotin für Durchflusszytometrie	Southern Biotechnology Associates, CA, USA
Goat anti-rabbit biotinyliert für Immunzytologie	DAKOCytomation, Glostrup, Dänemark
Humaner leucinzipper [LZ] TRAIL	Apogenix GmbH, Heidelberg
Humanes TNF-R1-Fc	Apogenix GmbH, Heidelberg
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MCL-1 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
PIPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Protein A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Streptavidin-PE für Durchflusszytometrie	PharMingen, Hamburg
TNFα	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TRAIL-R2-Fc	freundliche Gabe Dr. H. Walczak, DKFZ Heidelberg
Zweitantikörper anti-mouse IgG	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA, USA
Zweitantikörper anti-mouse IgG1	BD Transduction Laboratories™, Heidelberg
Zweitantikörper anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA, USA
Zweitantikörper anti-mouse IgG2a	BD Transduction Laboratories™, Heidelberg
β-Aktin Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
β-Tubulin Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.3. Primer, Nukleotide

BGH reverse Primer

5'd[TA GAA GGC ACA GTC GAG G]3'

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

cDNA für MCL-1 Überexpression

pEF4-mcl-1

pEF4-Leervektor

freundliche Gabe von Dr. med. H. Schulze-Bergkamen und
Dipl. Biol. B. Fleischer, Innere Med. I, Uni-Klinik Mainz

siRNA Sequenzen für mcl-1

5'-aagauacacagacguucucTT-3' (sense)

5'-TTuucauagugucgcaagag-3' (antisense)

MWG Biotech, Ebersberg

MWG Biotech, Ebersberg

siRNA Sequenzen für gfp

5'-ggcuacguccaggagcgaccTT-3' (sense)

5'-TTccgaugcagguccucgcgugg-3' (antisense)

MWG Biotech, Ebersberg

MWG Biotech, Ebersberg

T7-Primer

5'd[TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG]3'

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.4. Adenovirale Konstrukte

Der adenovirale Transfervektor pACCMV.PLPASR, beschrieben von Bradham et al. (205), hat einen Cytomegalieviruspromoter (CMV), der Polylinker verfügt außerdem über zahlreiche Schnittstellen. Diese sind von 5' nach 3': Eco RI, Kpn I, Bam H I, Xba I, Sal I, Hind III. Das fadd Δ -Molekül wurde über die Schnittstellen Kpn I und Xba I in den adenoviralen Vektor, welcher in HEK 293-Zellen vermehrt wurde, eingebracht. Abbildung 11 zeigt das Grundgerüst des Vektors mit weiteren Restriktionsschnittstellen.

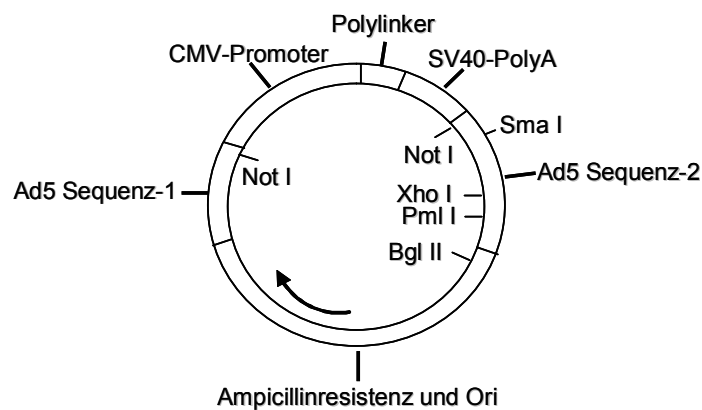
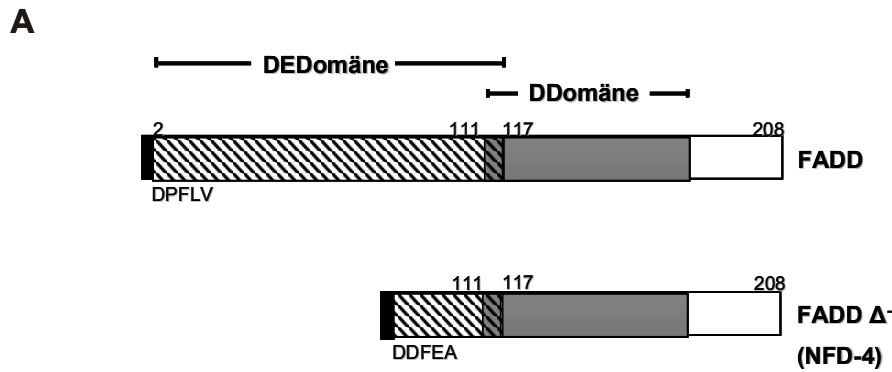


Abb. 11: Restriktionskarte des adenoviralen Vektors pACCMV.PLPASR. Der Polylinker verfügt außerdem über die Schnittstellen Eco RI, Kpn I, Bam H I, Xba I, Sal I, Hind III. FADD Δ wurde über Kpn I und Xba I in den Vektor einkloniert.

Die fadd-Mutantenform entspricht dem AU1-NFD-4-Molekül, welches von Chinnaiyan et al. (165, 206) beschrieben wurde und von Bradham et al. in einen Adenovirus eingebaut wurde (205). Die mutante Form beginnt bei Aminosäure 80 und endet, wie die WT-Form, bei Aminosäure 208 (Abb. 12).

**T7-Primer:**

As80 →

```

5'CTTGGTACCATGGACACATACCGCTACATGACGACTTCGAGGCGGGGGCGGCGGCCGGGGCCGCGCCTGGGG
AAGAAGACCTGTGTGCAGCATTAAACGTCATATGTGATAATGTGGGAAAGATTGGAGAAGGCTGGCTCGTCAGC
TCAAAGTCTCAGACACCAAGATCGACAGCATCGAGGACAGATACCCCGCAACCTGACAGAGCGTGTGCGGGAG
TCACTGAGAATCTGGAAGAACACAGAGAAGGAGAACGCAACAGTGGCCACCTGGTGGGGGCTCTCAGTCTCTG
CCAGATGAACCTGGTGGCTGACCTGGTACAAGAGGTTCAAGCAGGCCCGTGACCTCCAGAACAGGAGTGGGGCCA
TGTCCCGATGTCATGGAACCTCAGACGCATCTACCTCGAAGCGTCTGAGGATCCTCGAGCATGCATCTAGAGGG
CCCTATTCTATAGTGTCACTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGT
TGTTGCCCTCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGT3'

```

BGH reverse Primer:

```

5'CTCTAGCATTAGGTGACACTATAGAATAGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGGATCCTCAGGACGCTTCGGAGGT
AGATGCGTCTGAGTTCATGACATCGGGGACATGGCCCCACTCCTGTCTGGAGGTCACGGGCTGCTGAACCTC
TTGTACCAGGTCAGCCACCAGGTTTCATCTGGCAGGACCTGAGAGCCCCACCAGGTGGCCACTGTTGCGTTCTC
CTTCTCTGTGTTCTCCAGATTCTCAGTGACTCCCGCACACGCTCTGTCAGGTTGCGGGGGTATCTGTCTCGATGC
TGTCGATCTTGGTGTCTGAGACTTTGAGCTGACGAGCCAGCCTTCTCCAATCTTTCCCCACATTATCACATATGACG
TTAAATGCTGCACACAGGTTCTTCTCCAGGCGCGGCCCGGGCCCGCCCGCCCGCCCTCGAAGTCGTCGATGTAG
CGGTATGTGCCATGGTACCAAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTCGATAAGCCAGTAAGCAGTGG
GTTCTCTAGTTAGCCAGAGACTCTGCTTATATAGACCTCC3'

```

Abb. 12: Beschreibung des FADD Δ -Moleküls auf Protein- und DNA-Ebene. **A:** Schematische Darstellung des WT-FADD-Proteins im Vergleich zu FADD Δ . DED: *death effector domain*, schraffiert. DD: *death domain*, grau unterlegt. Aminosäuresequenz DPFLV: Asparaginsäure, Prolin, Phenylalanin, Leucin, Valin. Aminosäuresequenz DDFEA: Asparagin, Asparagin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Alanin. Abbildung nach Chinnayan et al. (206). **B:** DNA-Sequenz für FADD Δ . Oben: Sequenzierung mit T7-Primer. Unten: Sequenzierung mit BGH reverse Primer. Die codierende Region für das FADD Δ -Molekül (fett gedruckt) beginnt bei Aminosäure 80, Asparaginsäure.

Der Adenovirus mit dem eingebauten fadd Δ -Konstrukt war eine freundliche Gabe von Prof. Ch. Trautwein, Innere Medizin III, Universitätsklinikum Aachen.

Zur Kontrolle wurde ein replikationsdefizienter adenoviraler Vektor (rAd.RSV β -Gal) mit einem Typ5-Adenovirusgenom verwendet. Das lac-z-Gen, welches das Enzym β -Gal kodiert, wird durch den Promoter *Rous sarcoma virus* (RSV) kontrolliert (207). Der Ad β -Gal-Kontrollvirus war eine freundliche Gabe von PD Dr. K. Brand, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Heidelberg.

2.1.5. Eukaryonte Zellen

2.1.5.1. HepG2, Hepatoblastomzellen

Die HepG2-Linie wurde von der *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, VA, USA, bezogen. Sie stammt vom humanen Hepatoblastom und wurde von Aden et al. beschrieben (200). HepG2-Zellen zeichnen sich durch die Expression von WTp53 aus (160, 208). Kultiviert wurden die Zellen in DMEM-Medium.

2.1.5.2. HuH-7, Hepatoblastomzellen

Die HuH-7-Zelllinie stammt von der *Japan Health Science Foundation*, Osaka, Japan. Die Zellen wurden aus dem HCC eines 57 Jahre alten Patienten etabliert (201). Die Zelllinie wurde in DMEM-Medium kultiviert.

2.1.5.3. T47D, Mammakarzinomzellen

T47D-Zellen wurden von ATCC (s.o.) bezogen. Die Zelllinie, isoliert und beschrieben von Keydar et al, wurde aus dem duktalem Mammakarzinom generiert (209). Die Zellkultur wurde in RPMI-Medium durchgeführt.

2.1.5.4. HEK 293-Zellen

HEK 293 wurde von Graham et al. charakterisiert (210) und stammen von fötalen Nierenzellen ab. Die Zellkultur erfolgte in MEM-Medium

2.1.6- Medien für die Zellkultur

Medium für HepG2- und HuH-7-Zellen

DMEM-Grundmedium	500 ml
Gentamycin (10 mg/ml)	5 ml
FCS	50 ml

T47D-Medium

RPMI Grundmedium	500 ml
Penicillin G 10.000 U/ml-Streptomycin 10 mg/ml	5 ml
FCS	50 ml

PHH-Medium

Williams-Medium E	500 ml
L-Glutamin (200 mM)	5,6 ml
Glukose (5%)	6 ml
HEPES (1M)	11,5 ml
Penicillin G 10.000 U/ml-Streptomycin 10 mg/ml	5,6 ml
Gentamycin 10 mg/ml	5 ml
Hydro-Cortison (4,85 mg/ml)	0,5 ml
Insulin (285 µg/ml)	1,4 ml
DMSO	8,7 ml

2.1.7. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Untersuchungen**Blockierungspuffer**

PBST	1x
Magermilchpulver	5 %

Blockierungspuffer 1 für Immunzytologie

PBS	
Triton-X	0,3 % (V)
Magermilchpulver	5 % (W)

Blockierungspuffer 2 für Immunzytologie

PBS	
Triton-X	0,3 % (V)
Magermilchpulver	2 % (W)

DAPI-Stammlösung

H ₂ O	
DAPI	1 mg/ml

DAPI-Arbeitslösung

Methanol	
DAPI-Stammlösung	1:1.000

DiOC₆(3)-Lösung

PBS	
DiOC ₆ (3) (4 µM in DMSO)	40 nM

Lösung für Formazankristalldetektion

Isopropanol	
Ameisensäure	5 %

JC-1 Lösung

DMSO	
JC-1	1 mg / ml

MTT-Lösung

PBS	
MTT	5 mg/ml

Nicoletti- Puffer

Triton X-100	0,10 %
Na-Citrat	0,10 %
Propidiumjodid	30 µg/ ml

PBS 20x

NaCl	2,74 M
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10,14 mM
ad 800 ml	
pH 7,4 einstellen	
ad 1000 ml	

PBST

PBS (20x, pH 7,4)	1x
TWEEN 20	0,1 %

Probenpuffer 5x für Gelelektrophorese

Glycerol (99 %)	50 %
SDS	15 %
Bromphenolblau	0,0025 %
β-Mercaptoethanol	25 %
ad H ₂ O	

Puffer 1 für *enhanced chemiluminescence* (ECL)

Tris-HCl (pH 8,5)	0,1 M
p-Cumarinsäure (90 mM)	0,4 mM
Luminol (250 mM)	2,5 mM

Puffer 2 für ECL

Tris-HCl pH 8,5	0,1 M
H ₂ O ₂ (30 %)	0,055 % (V)

Puffer für Gesamtproteinlysate

DTT (200x)	1x
Chaps (10x)	1x
Proteinaseinhibitorcocktail (50x, Sigma)	1x
Ad H ₂ O	

Puffer für mitochondriale Proteinlysate

Sucrose (1 M)	250 mM
Hepes (200 mM)	20 mM
KCl (100 mM)	20 mM
MgCl ₂ (15 mM)	1,5 mM
EDTA (10 mM)	1 mM
EGTA (11 mM)	2 mM
DTT (1 M)	1 mM
PMSF (200 mM)	0,1 mM
Aprotinin (1,54 mM)	1,232 μM
Leupeptin (10 mM)	4,2 μM

TBS 10x

Trizma	200 mM
NaCl	1,37 M
ad 800 ml	
pH 7,6 einstellen	
ad 1000 ml	

TBST

TBS (10x)	1x
TWEEN 20	0,1 %

Triton Puffer

Tris-HCL (1,5 M u. pH 7,4)	20 mM
NaCl (4 M)	137 mM
Glycerin	10% (V)
Triton X-100 (10%)	1% (V)
EDTA (500 mM)	2 mM
SPI Proteinaseinhibitorcocktail (100x)	1x
PMSF (100 mM)	1 mM
NaVO ₄ (200 mM)	0,4 mM
NaF (500 mM)	10 mM
ad H ₂ O	

Western-Blot-Laufpuffer

Glycin	190 mM
Triszma	25 mM
SDS (10 %)	1 % (V)
ad H ₂ O	

Western-Blot-Transferpuffer

Glycin	190 mM
Triszma	25 mM
SDS (10 %)	0,38 % (V)
Methanol (99 %)	20 % (V)
ad H ₂ O	

2.1.8. Gele**Western-Blot: upper buffer für Sammelgel**

Tris	0,5 M
SDS (10 %)	0,4 %
pH auf 6,8 einstellen	
ad H ₂ O	

Western-Blot: lower buffer für Trenngel

Tris	1,5 M
SDS (10 %)	0,4 %
pH auf 8,8 einstellen	
ad H ₂ O	

Western-Blot: Sammelgel 5 %

Für ein Gel:	
H ₂ O	7,4 ml
Acrylamid (30 %)	2,1 ml
Western Blot Upper Buffer	3,3 ml
APS (10 %)	128,3 µl
TEMED	17,1 µl

Western Blot: Trenngel 10 %

Für ein Gel:	
H ₂ O	12,3 ml
Acrylamid (30 %)	9,7 ml
Western Blot Lower Buffer	7,23 ml
APS (10 %)	70,44 µl
TEMED	31,7 µl

Western Blot Trenngel 12 %

Für ein Gel:	
H ₂ O	10,4 ml
Acrylamid (30 %)	11,64 ml
Western Blot Lower Buffer	7,23 ml
APS (10 %)	70,44 µl
TEMED	31,7 µl

Western Blot Trenngel 15 %

Für ein Gel:	
H ₂ O	7,45 ml
Acrylamid (30 %)	14,55 ml
Western Blot Lower Buffer	7,23 ml
APS (10 %)	70,44 µl
TEMED	31,7 µl

2.1.9. Geräte und Verbrauchsmaterial

Agilent 2100 Bioanalyzer	Ambion GmbH, Kassel
Arbeitsbank Steril BSB4A	Gelaire Flow Laboratories, Opera/Italien
Bio- Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
BioDocAnalyzer	Whatman Biometra GmbH i.L., Göttingen
Biofuge Fresco Tischzentrifuge	W.C. Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau
Biomax MS-Film Scientific Imaging	Kodak GmbH, Stuttgart
C1 konfokales Mikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf
chamber slides	Shandon Lipshaw Inc., Pittsburg, PA, USA
CO2-Inkubator	WTC Binder, Tuttlingen
Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
DC200 Mikroskop	Leica, Wetzlar
Digital Graphic Printer UP-D890	Sony Deutschland GmbH, Köln
Easy Cast Electrophoresis System	Owl Scientific Inc., Woburn MA/USA
Elisa Reader Multiscan Ascent	Thermo Electron Corporation, Dreieich
FACS Calibur Flow Cytometer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACScan-Flow Cytometer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Falcon 70µm Nylon Cell- Strainer	BD Biosciences/ PharMingen/Clontech, Heidelberg
FLUOstar Galaxy Fluorometer stimmt das?	BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA
Forma Scientific Steri-Cult 200 Inkubator	Thermo Electron GmbH, Bremen
French Pressure Cell Press	SLM Aminco Instruments GmbH, Büttelborn
FujiBas Phosphoimager	Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf
Hyperfilm/Chemiluminescence Film	Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
Imagemaster-System	Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
Mikroskop Typ 090-131.001	Leica, Wetzlar
Minisart Filter 0,45/ 0,22µm	Sartorius GmbH, Göttingen
Nitrozellulose Membran Hybond ECL	Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP Test Tubes steril 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Robocycler Gradient 40	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Röntgenkassette	REGO X-Ray GmbH, Augsburg
Schlauchpumpe MasterFlex L/ S	Cole-Parmer Instrument Company Ltd., London, UK
Semi-dry-Blotkammer	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Spectra max Plus Microplate Reader 384	Molecular Devices GmbH, Ismaning b. München
Standzentrifuge Rotanda/TRC	Hettich, Tuttlingen
SterilGard Arbeitsbank	The Baker Comp Inc, Sanford ME/ USA
Tischzentrifuge	W.C. Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau
Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Varifuge 3.0R Zentrifuge	W.C. Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau
Zellkulturflaschen 25, 75, 182 cm ² mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten 6-, 12-, 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.10. Software

AlphaEaseFC 4.0 für Windows	Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA
Cell Quest Software System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
GraphPad InStat 3.01	GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.
SAS Software System	SAS Institute Inc., Cary/ NC, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Kultur der Zelllinien

Die Zellkultur fand ausschließlich unter sterilen Bedingungen statt. Dazu wurden alle Medien, Behandlungsmedien, Kulturgefäße und Hilfsmittel wie Pipetten steril verwendet und unter der Sterilbank gearbeitet. Kultiviert wurden die Zelllinien in ihrem entsprechenden Medium in 4, 12 und 24 ml (bezogen auf das Volumen des Kulturmediums) großen Flaschen mit sterilem Filter.

HepG2 u. HuH-7: DMEM-Medium

T47D: RPMI-Medium

Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle drei Tage, wenn die Zellen ausreichend konfluent waren, wurden die Kulturen 1:4 bis 1:5 passagiert. Dafür wurde das gebrauchte Medium abgenommen, die Zellen drei mal mit sterilem PBS gewaschen, mit Hilfe des Verdauungsenzyms Trypsin von der Unterlage abgelöst und in frischem Medium in verschließbaren Plastikröhrchen aufgenommen. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen, frisches Medium zugegeben und das Zellpellet mit der Pipette aufgelöst, bis eine homogene Suspension hergestellt war. Für Versuche wurde zuerst die Zellzahl der Suspension in der Neubauer-Kammer bestimmt und nachfolgend die Suspension mit frischem Medium auf 30.000 Zellen pro cm² Kulturfläche der unbeschichteten *well*-Platten und Kulturschalen eingestellt:

96 *wells*: 0,3 cm² pro *well*

24 *wells*: 2 cm² pro *well*

12 *wells*: 3,6 cm² pro *well*

6 *wells*: 9,6 cm² pro *well*

5 cm-Schalen*: 21 cm² pro Schale

10 cm-Schalen*: 58 cm² pro Schale

* bezogen auf den Durchmesser der Schale

Die Experimente wurden am Tag nach der Aussaat, wenn die Zellen adhärent waren, durchgeführt.

2.2.2. Kultur von primären Hepatozyten

Primäre Hepatozyten (PHH) wurden von leberteilresektierten Patienten, welche der Verwendung des entnommenen Gewebes zu wissenschaftlichen Zwecken zugestimmt hatten, gewonnen. Für dieses Vorgehen war die Genehmigung von der Ethikkommission der Universität Heidelberg eingeholt worden. Das Patientenmaterial wurde in Kooperation mit Prof. Dr. H. Friess und Dr. Ch. Michalski, Chirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Isolation der frisch resezierten Leberproben sowie die Kultur der PHHs wurde freundlicherweise in Kooperation mit PD Dr. M. Müller-Schilling und Dr. A. Koch, Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Heidelberg, durchgeführt. Dabei wurde eine modifizierte Kollagenase-Perfusion in zwei Schritten angewendet, wie es bei Schulze-Bergkamen et al. beschrieben wurde (211). Die Aussaat und Kultur von PHHs wurde entsprechend der Beschreibung von Schulze-Bergkamen et al. durchgeführt (196).

2.2.3. Prokaryote Zellkultur

2.2.3.1. Aufzucht und Reinigung von Adenoviren

Für die Infektion mit Adenoviren wurden 20 Millionen HEK 293-Zellen in großen Flaschen (24 ml) ausgesät. Am Folgetag wurden die Viren mit 0,6 moi (*multiplicity of infection*) pro HEK 293-Zelle infiziert. Hierfür wurde die entsprechende Menge aus dem Virus-*stock* entnommen und in Mangelmedium mit 2 % FCS überführt. Das Medium der HEK 293-Zellen wurde vorsichtig abgenommen und das Mangelmedium mit den Viren vorsichtig am Rand zupipettiert. Die Zellkultur wurde unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen so lange inkubiert, bis ein zytopathischer Effekt sichtbar wurde, die Zellen aber noch nicht vollständig abgelöst oder abgerundet waren. Aufgrund der infektionsbedingten Zellschädigung konnten die Zellen durch Abspülen des Zellrasens geerntet werden. Anschließend wurden sie in Röhrchen überführt und über Nacht bei -80°C gelagert. Am Folgetag erfolgten drei Frier- und Tau-Schritte bei -80°C und 37°C, um die HEK 293-Zellen aufzubrechen. Danach wurden in zwei Zentrifugationsschritten die Zellreste von dem Viren enthaltenden Überstand abgetrennt. Diese Zentrifugationen erfolgten über fünf Minuten bei 4°C und 2000 rpm. Im Anschluss wurde der virenhaltige Überstand mit 10 % Glycin (99 %) versetzt und aliquotiert. Die Adenoviren wurden bei -80°C gelagert. Da die Viren nur in Zellkulturexperimenten verwendet wurden, wurden weitere Reinigungsschritte, wie sie für Tierversuche üblich sind,

wie die Ultrazentrifugation über einen CäCl-Gradienten etc, nicht durchgeführt.

2.2.3.2. Titerbestimmung

Der Virustiter wurde in den Hepatomzellen wie folgt bestimmt: HuH-7- und HepG2-Zellen wurden in 24-*well*-Platten ausgesät. Am Folgetag wurden die Adenoviren jeweils mit dem FADD Δ -Molekül und dem β -Gal-Insert in steigenden Volumina aus dem Virus-*stock* zupipettiert: 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l, 50 μ l, 80 μ l und 100 μ l. Hierfür wurde der *stock* jeweils mit *storagebuffer* so verdünnt, dass jede Konzentration mit 100 μ l auf die Zellen gegeben wurde. Nach vier Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. 24 Stunden nach Viruszugabe wurde geschätzt, wieviel % der Zellen noch adhären und wie hoch der prozentuale Anteil der Zellen im Überstand war. Die infektiösen Einheiten (*infection units*, i.u.) pro μ l Virus-*stock* berechneten sich für 50 % noch adhären Zellen nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl bei Infektion} \times 0,5 \times 3}{\text{Volumen Virus-stock } [\mu\text{l}]}$$

2.2.4. Behandlungen der Zellen

2.2.4.1. Behandlung mit SC-58635

Zunächst wurde eine Stammlösung von 50 mM SC-58635 in DMSO erstellt. Für die ersten Experimente (Kap. 3.2.) wurde eine Verdünnungsreihe von 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M und 10 μ M gelöst in Kulturmedium erstellt. Aus den daraus gewonnenen Ergebnissen (Kap. 3.2.) wurden 100 μ M SC-58635 für alle nachfolgenden Behandlungen, wenn nicht anders erwähnt, als Standardkonzentration verwendet.

2.2.4.2. Zugabe von PGE₂

In früheren Versuchen wurde als wirksamste Konzentration 3 μ g/ml PGE₂ für Hepatomzellen identifiziert (45). Die Stammlösung von 100 mg/ml PGE₂ in DMSO wurde 1:200 mit PBS verdünnt und davon je 3 μ l in 500 μ l Medium pipettiert.

2.2.4.3. Inhibition der Caspasen

Die Inhibition der Caspasen erfolgte mittels folgender Fluoromethylketone (FMK):

Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK (Z-VAD-FMK) als Pan-Caspase-Inhibitor (pCI), der Z-Asp(OCH₃)-Glu(OCH₃)-Val-Asp(OCH₃)-FMK (Z-DEVD-FMK) als Caspase-3-Inhibitor (C3I), Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-FMK (Z-IETD-FMK) als Caspase-8-Inhibitor (C8I), Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-FMK (Z-LEHD-FMK) als Caspase-9-Inhibitor (C9I).

Die eingesetzte Konzentration betrug im jeweiligen Standardmedium 50µM und wurde der Literatur entnommen (212-216). Für eine optimale Inhibitionswirkung wurden die Zellen zwölf Stunden mit den Inhibitoren vorbehandelt. Danach wurde das Medium in sterile Röhrchen überführt und der selektive COX-2-Inhibitor in der Standardkonzentration 100 µM zugegeben. Im Anschluss wurden alle Behandlungsansätze vorsichtig wieder auf die Zellen gegeben. Mit den Behandlungen ohne SC-58635 wurde das Medium ebenfalls abgenommen und wieder zupipettiert.

2.2.4.4. Stimulierung der Todesrezeptoren CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2

Die Stimulierung der Todesrezeptoren erfolgte über ihre jeweiligen Agonisten:

CD95 wurde mit dem polyklonalen Antikörper anti-Apo-1 IgG3 in Verbindung mit Protein A angeregt. TNF-R1 wurde mittels TNF α stimuliert, was sowohl Apoptose induzieren als auch als Wachstumsfaktor über die Induktion von NF κ B antiapoptotisch wirken kann. Für eine Apoptose induzierende Wirkung muss NF κ B inhibiert werden, wozu meist Cycloheximid (CHX) verwendet wird (173). So wurde für die Untersuchung der TNF α induzierten Apoptose CHX z.B. in HuH-7-Zellen (29-31) und in murinen Hepatomzellen (217) zugegeben. In Endothelzellen konnte die Apoptose mit der Zugabe von CHX wesentlich erhöht werden (218). Für die Experimente, die die Apoptose über TNF α /TNF-R1 vermittelt untersuchen, wurden 10 µg/ml CHX verwendet. Leucin Zipper (LZ)-TRAIL, stellt eine stabile trimerisierte Form des TRAIL-Liganden (219), welcher TRAIL-R1 und -R2 gleichermaßen anspricht, dar (154). Der LZ-TRAIL war eine freundliche Gabe von Prof. Dr. Henning Walczak, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.

Die Zellen wurden in 24-*well*-Platten ausgesät und am Folgetag gleichzeitig mit 100 µM SC-58635 und jeweils den entsprechenden Liganden in *Tripletts* für 24 Stunden behandelt. Dabei wurden die Liganden und deren Komponenten in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Anti-Apo-1	1 µg/ml	mit	Protein A	20 ng/ml
TNF α	0,1 µg/ml	mit	CHX	10 µg/ml
LZ-TRAIL	1 µg/ml			

Jede Behandlung wurde in Kulturmedium angesetzt, das alte Kulturmedium abgesaugt und das Behandlungsmedium auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde die Apoptose mit der Nicoletti-Färbung in der FACS-Analyse bestimmt.

2.2.4.5. Behandlung mit Zytostatika

Folgende klinisch relevante Zytostatika wurden in Kombination mit SC-58635 oder alleine in den angegebenen Konzentrationen über 48 Stunden eingesetzt:

Bleomycin	3 und 30 µg/ml
Doxorubicin	0,5 und 5 µg/ml
Mitoxantron	0,1 und 1 µg/ml

Die Konzentrationen stützten sich auf Arbeiten von Gressner et al. (212) und Müller et al. (160, 212, 213).

Die Zellen wurden am Vortag in 24-well-Platten ausgesät und am Folgetag in *Tripletts* behandelt. Dafür wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und das Behandlungsmedium vorsichtig zugegeben. Nach 48 Stunden erfolgte die FACS-Analyse nach Nicoletti-Färbung.

2.2.5. Subzelluläre Lokalisation von COX-2 mittels immunhistochemischer Färbung in unbehandelten Hepatomzellen

Die Zellen wurden in *chamber slides* ausgesät und am zweiten Tag mit der Färbung begonnen. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Methanol, welches bei -20°C gelagert wurde, zehn Minuten fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 20 Minuten in 0,3 % H₂O₂ in Methanol bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgende Blockierung von Albumin wurde mit dem Blockierungspuffer 1 für Immunzytologie über 1,5 Stunden durchgeführt. In diese Lösung wurde der COX-2-Erstantikörper in der Verdünnung 1:100 hinzugegeben und die Zellen damit über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, worauf die Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper *goat-anti-rabbit* (1:300) in Blockierungspuffer 2 für Immunzytologie über 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Danach erfolgten wiederum drei Waschschrte mit PBS, worauf die Verstärkungsreaktion über die Bildung eines makromolekularen Komplexes aus Avidin und biotinylierter Peroxidase durchgeführt wurde. Hierfür wurde das "Vectastain[®] Elite ABC Kit"

verwendet und die Zellen gemäß der Anleitung nochmals 30 Minuten bei Raumtemperatur in der entsprechenden Lösung inkubiert. Danach erfolgte die DAB-Detektion mit Hilfe des *DAB-Kits* entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die Kerne wurden mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt.

2.2.6. Vitalitäts-Test (MTT)

Dieser Test basiert auf der Umwandlung von Tetrazoniumsalz (MTT-Reagenz) in Formazanderivat aufgrund der Dehydrogenase-Aktivität von Mitochondrien gesunder Zellen (220). Der Farbumschlag der gelben, wasserlöslichen MTT-Lösung nach Violett bei der Bildung der Formazan-Kristalle kann im Elisa-Reader photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt werden. Dabei äußert sich die Menge der vitalen Zellen direkt proportional zur optischen Dichte.

Die Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät und am Folgetag entsprechend der Fragestellung immer sechs *wells* gleich behandelt. Nach Abschluss des Experimentes wurde pro *well* 25 µl, durch 0,2 µm Porengröße steril filtrierte, MTT-Lösung zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen unter Zellkulturbedingungen mit der Lösung sechs Stunden inkubiert. Nachdem das Medium abgenommen wurde, wurden die gebildeten Formazankristalle mit je 100 µl 5 % Ameisensäure in Isopropanol pro *well* gelöst, was durch einen violetten Farbumschlag sichtbar wurde. Die Platten wurden in Frischhaltefolie über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und am Folgetag die Extinktionswerte wie oben beschrieben mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt.

Für die Auswertung wurde der Mittelwert der unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt. Die graphische Darstellung gab entsprechend den relativen Anteil der vitalen Zellen als Zellvitalität [%] über den Behandlungen an.

2.2.7. FACS-Analysen

Für alle FACS (*fluorescent activated cell sorter*)-Analysen wurden folgende Kriterien beachtet: Da sich die Apoptoseexekution auch auf das Adhärenzverhalten der Zellen auswirkt, wurden die Zellen aus dem Überstand mit den adhären Zellen der jeweiligen Probe vereinigt und zusammen gemessen. Die so vereinigten Proben werden bei der Beschreibung der einzelnen Färbungen als *gepoolte* Proben bezeichnet. Für optimale optische Ergebnisse wurden pro Probe je 10.000 Ereignisse gemessen. In der Regel entsprechen diese Ereignisse jeweils einer Zelle. Da aber bei jeder Messung auch Debris mit gemessen wird, spricht man zunächst neutral von "(modellierten) Ereignissen". Auch bei Apoptosemessungen werden

aufgrund des *Blubbings* der Zellen nicht nur ganze Zellen sondern auch vor allem mit Membranen eingeschnürte Zellbestandteile gemessen. Die Güte der Zellmorphologie wurde über die Parameter *Forwardscatter* (FSC) und *Sidewardscatter* (SSC) beschrieben: Dabei gibt FSC die Größe der Zellen an und SSC gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. In der unbehandelten Kontrolle wurde die Punktwolke im Diagramm SSC über FSC unterhalb der Winkelhalbierenden liegend eingestellt. So wurde das Messen von morphologisch noch intakten Zellen gewährleistet. Diese Einstellungen wurden für alle nachfolgenden Messungen beibehalten.

2.2.7.1. Apoptosenachweis mit Nicoletti-Färbung

Propidium-Jodid (PI) bindet an die Basenpaare AT und GC der unbeschädigten DNA, was zu einer intensiven Rotfluoreszenz führt, welche demnach in der G₂-Phase stärker als in der G₁-Phase des Zellzyklus ist. In der FACS-Analyse wird die Rotfluoreszenz bei 650 nm gemessen und die Zellzyklusphasen entsprechend als G₀/G₁-Peak und G₂-Peak sichtbar (Abb. 13). Wird nun die DNA während der Apoptose exekution degradiert, bindet der Farbstoff zunehmend schlechter an die DNA, womit auch die Rotfluoreszenz schwächer wird. Die daraus resultierende Zunahme von Ereignissen mit schwächerer Rotfluoreszenz wird in der FACS-Analyse links des G₀/G₁-Peaks sichtbar und als Sub-G₁-Peak bezeichnet (Abb. 13),

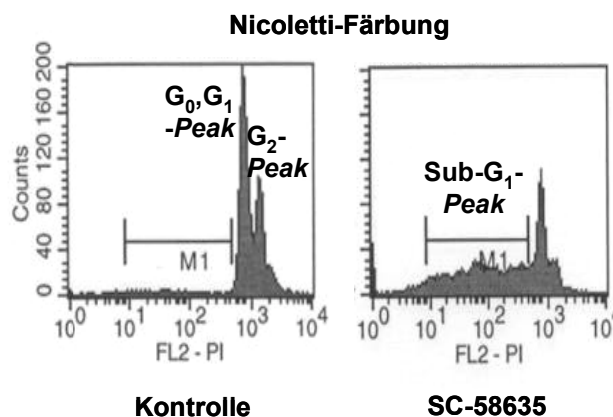


Abb. 13: FACS-Analyse der Nicoletti-Färbung von HepG2-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl der gezählten Ereignisse (Y-Achse) über der Rotfluoreszenz bei 650 nm in Kanal 2. Wird die DNA in der Apoptose degradiert, wird die Fluoreszenz schwächer. Der Peak mit der höchsten Färbintensität stellt die G₂-Phase (*G₂-Peak*), die durch den doppelten Chromosomensatz ausgezeichnet ist, dar. Dem G₀/G₁-Peak entsprechen die G₀ bzw. G₁-Phase mit ihrem einfachen Chromosomensatz. Die Kontrolle zeigt ein typisches Bild von unbehandelten, gesunden Zellen. Bei Apoptose brechen die Peaks ein (rechtes Bild). Im Bereich links des G₁-Peaks entsteht ein neuer, so genannter Sub-G₁-Peak, die Zellen sind schwächer gefärbt. Der Marker (M₁) wurde über den Sub-G₁-Peak gelegt, die Zellanzahl in % aller gezählten Ereignisse (10.000) angegeben.

welcher in der Auswertung als Apoptose [%] dargestellt wurde. Da PI selbst nur schlecht Membranen überwindet, wurden sie mit Hilfe des Nicoletti-Puffers (221) für PI durchlässig gemacht, wodurch PI bis zur DNA transportiert werden kann.

Die Zellen wurden in 24-*well*-Platten ausgesät und entsprechend der Fragestellung in *Triplets* behandelt. Nach Abschluss des Experimentes wurden die *gepoolten* Proben fünf Minuten mit 3.000 rpm bei 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit je 1 ml PBS pro Probe gewaschen. Danach wurden die Proben fünf Minuten mit 3.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 50 µl abgenommen. Die Zellen wurden zunächst in den 50 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von je 100 µl Nicoletti-Puffer noch einmal resuspendiert. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4°C lichtgeschützt im Puffer für sechs bis 24 Stunden inkubiert.

2.2.7.2. Nachweis der Mitochondrienaktivierung über die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1-Färbung

Der JC-1-Farbstoff bildet bei intaktem mitochondrialen Membranpotential in der Membran Aggregate (216, 222), welche orange fluoreszieren. Im Gegensatz dazu werden bei Zusammenbruch des Membranpotentials verstärkt grün fluoreszierende Monomere gebildet, da sich der Farbstoff nicht mehr so gut in der Membran einlagern kann. Die Änderung des Membranpotentials führt somit zu einer Verschiebung der intensiven orangen Fluoreszenz bei 575 nm in den grün fluoreszierenden Bereich bei 525 nm. Abbildung 14 zeigt zwei typische Histogramme für die Farbverschiebung von Orange, was in der FACS-Analyse der Fluoreszenz 1 (FL 1) entspricht, nach Grün entsprechend FL 2 (223). Das Fadenkreuz für die Auswertung wurde in der unbehandelten Kontrolle so gelegt, dass sich maximal 10 % der Ereignisse im rechten unteren Quadranten, der die intensivere Grünfluoreszenz mit gleichzeitig schwächerer Orange fluoreszenz markiert, befinden. Die Auswertung erfolgte nach dem Prozentsatz der Zellen im rechten unteren Quadranten und wurde als JC-1-Färbung [%] angegeben.

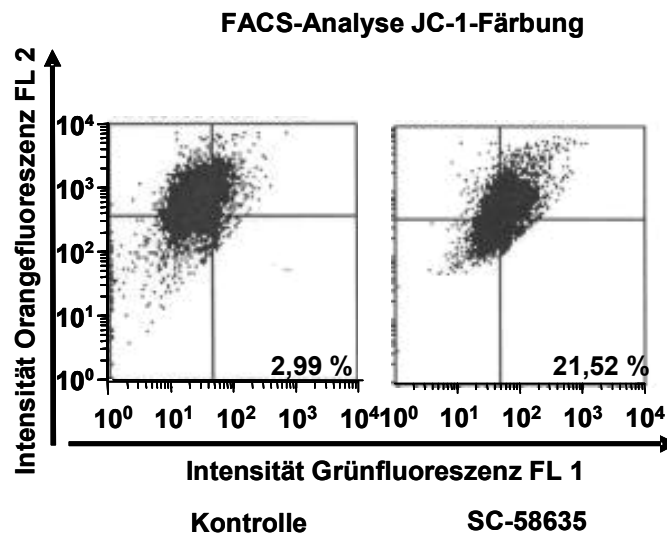


Abb. 14: JC-1-Färbung von HuH-7-Zellen . Änderung des Membranpotentials während zwei Stunden SC-58635-Behandlung (100 μ M). Histogramm und Auswertung einer FACS-Analyse mit dem CellQuest-Programm. Die Intensität der Orange fluoreszenz wurde bei 575 nm in FL 2 und der Grün fluoreszenz bei 525 nm in FL 1 dargestellt. Das Fadenkreuz zur Auswertung wurde so gelegt, dass maximal 10 % der Ereignisse im rechten unteren Quadranten erfasst wurden. Nach SC-58635-Behandlung erfolgte die Verschiebung der Punktelcke von Orange nach Grün. Somit wurden in diesem Beispiel 21,52 % Ereignisse erfasst.

Die Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und entsprechend der Fragestellung immer sechs Proben gleich behandelt. Nach Beendigung des Experimentes wurden die Zellen geerntet, mit dem entsprechenden Überstand vereinigt und anschließend fünf Minuten mit 3.000 rpm in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 0,5 ml PBS aufgenommen. Pro Probe wurden 2,5 μ l JC-1-Lösung dazugegeben, die Zellen in der Färbelösung resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach zwei Waschschrinen mit je 0,5 ml PBS bei 4°C wurden die Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert und sofort lichtgeschützt auf Eis der FACS-Messung zugeführt.

2.2.7.3. Nachweis der Mitochondrienaktivierung über die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mit DiOC₆(3)-Färbung

DiOC₆(3) gehört zu den Carbozyaninen, ist lipophil und färbt in geringen Konzentrationen selektiv Mitochondrien aber auch Golgi-Vesikel lebender Zellen. Dies ist als grüne Fluoreszenz detektierbar, welche bei der Depolarisation des Membranpotentials schwächer wird (223). In der FACS-Analyse findet eine Verschiebung des *Peaks* in FL 1 (grüne Fluoreszenz bei 525 nm) nach links also in Richtung schwächerer Fluoreszenzintensität statt (Abb. 15). Der Anteil Zellen mit schwächerer Grün fluoreszenz wurde in der FACS-Analyse

über den Markerbereich (M1) bestimmt. M1 wurde über die schwächste Intensität bis zum Beginn des *Peaks* gelegt. Dadurch waren in der unbehandelten Kontrolle etwa bis zu 25 % Zellen im Markerbereich.

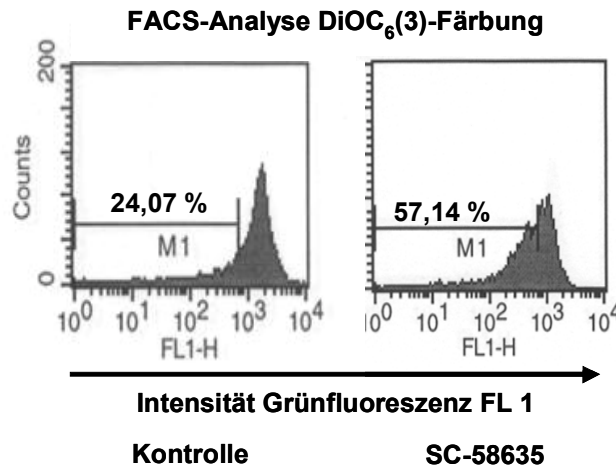


Abb. 15: DiOC₆(3)-Färbung von HuH-7-Zellen. Das linke Diagramm zeigt unbehandelte Zellen, welche überwiegend intensiv grün fluoreszieren. Nach zwei Stunden SC-58635-Behandlung wurde die Grünfluoreszenz für 57, 14 % der Zellen schwächer, sichtbar auch an der Verschiebung des *Peaks*.

Die Zellen wurden analog zur JC-1-Färbung ausgesät und ebenfalls jeweils 6 Proben gleich behandelt. Die Färbung erfolgte gemäß der JC-1-Färbung (Kap. 2.2.7.2.), mit folgender Ausnahme: Die Zellen wurden in 0,5 ml DiOC₆(3)-Lösung 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank lichtgeschützt inkubiert.

Im Gegensatz zur FACS-Analyse der Nicoletti-Färbung, welche für unbehandelte Zellen eine klare Darstellung der Zellzyklusphasen an zumeist festen Positionen wiedergibt, zeigen die Mitochondrienfärbungen Farbverschiebungen ohne weitere typische Charakteristika. Somit sind die Auswertungen nicht nur von der optischen Qualität der Histogramme abhängig sondern unterliegen auch einer gewissen Subjektivität des Experimentators. Daher wurden zu Beginn der Untersuchungen des Mitochondrienpotentials beide Färbungen gegenübergestellt. Für einen Vergleich der JC-1- und DiOC₆(3)-Färbung wurden die jeweils unbehandelten Kontrollen bei den Versuchen mit HepG2-Zellen gleich 10 % und mit HuH-7-Zellen gleich 5 % gesetzt. Da mit JC-1 und DiOC₆(3) gleichermaßen der SC-58635-Effekt auf die Depolarisierung des Potentials gezeigt werden konnte, wurde in weiterführenden Versuchen nur eine Färbung – zumeist mit DiOC₆(3) – durchgeführt.

2.2.7.4. Färbung der Todesrezeptoren für die FACS-Analyse

Mit jeweils spezifischen Antikörpern wurden die Todesrezeptoren CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auf der Außenseite der Zellmembran eingefärbt. Mit Hilfe der FACS-Analyse kann somit die Expression der Todesrezeptoren an der Zelloberfläche quantifiziert werden. Eine gleichzeitige PI-Färbung aller Proben ermöglichte die Erfassung toter Zellen, welche von der Messung ausgenommen werden konnten. Damit konnte eine Aussage getroffen werden, wie stark bestimmte Todesrezeptoren bei Apoptoseinduktion durch SC-58635 an die Zelloberfläche transportiert werden.

Die Zellen wurden in 10-cm-Schalen ausgesät und am Folgetag entsprechend der Fragestellung mit SC-58635 unterschiedlich lange in *Tripletts* behandelt. Nach Versuche wurden die Zellen aus den Schalen mit 0,2 g/l EDTA in PBS abgelöst, die Reaktion wurde mit PBS, welches mit 10 % FCS versetzt wurde, gestoppt. Die Zellen wurden in Plastikröhrchen überführt und mit den entsprechenden Überständen vereinigt. Nach zehn Minuten Zentrifugation bei 1.100 rpm und 4°C wurde der Überstand bis auf 1 ml dekantiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis ausgeführt. Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurde in ein *well* einer 96- *well*-Platte überführt, womit aus jeder Einzelprobe ein Aliquot für jeden der Rezeptoren und den Isotyp, zur Kontrolle der Eigenfärbung der Antikörper, gewonnen wurde. Die Platten wurden fünf Minuten bei 1.400 rpm und 4°C in einer Standzentrifuge (Rotanta/TRC) zentrifugiert, die Überstände abgenommen, die Zellen mit je 50 µl der entsprechenden Erstantikörperlösung durch vorsichtiges Bewegen der Platte resuspendiert und 20 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein Waschschriff unter denselben Zentrifugationsbedingungen in der Standzentrifuge mit PBS, welches 2 % FCS enthielt. Danach wurden alle Proben mit 50 µl Zweitantikörperlösung *goat*-(F(ab)₂-anti-*mouse*-Biotin 20 Minuten dunkel auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die dritte Inkubation mit Streptavidin-APC zur Fluoreszenzfärbung ebenfalls 20 Minuten dunkel auf Eis. Vor der folgenden PI-Färbung wurden die Zellen noch einmal gewaschen.

Die Messung im FACS-Calibur erfolgte über den Ausschluss der positiv PI gefärbten Zellen in FL2. Die APC-Fluoreszenz wurde in FL4 gemessen. Die Messung war dann beendet, wenn mindestens 5.000 bis 10.000 Zellen gezählt waren. Für die Auswertung der gemessenen Daten wurden die Werte für den Isotyp jeweils von den Werten für die Antikörper abgezogen.

2.2.8. Apoptosenachweis mit DAPI-Färbung

Der DAPI-Fluoreszenzfarbstoff lagert sich spezifisch an die DNA an, wodurch blau fluoreszierende DAPI-DNA-Komplexe gebildet werden. Somit können zum einen Zellkerne vitaler Zellen optisch dargestellt werden, als auch in Folge der Apoptoseexekution kondensiertes Chromatin, welches eine leuchtende Blaufärbung zeigt.

Die Zellen wurden in 24-*well*-Platten ausgesät und nach der entsprechenden Behandlung mit der DAPI-Arbeitslösung einmal gewaschen. Danach wurden die Zellen mit frischer DAPI-Arbeitslösung bei 37°C 15 Minuten inkubiert und mit reinem Methanol gewaschen. Die Blaufluoreszenz wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

2.2.9. Test zur Caspasenaktivierung

Dieser Test wurde mit den *Fluorometric Assay Kits* für die jeweiligen Caspasen durchgeführt. Jeweils spezifische Caspasensubstrate wurden mit dem Fluorochrom AFC (7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) konjugiert (konj.), wobei folgende Peptide für die jeweiligen Caspasen verwendet wurden:

AFC conj. DEVD-Substrat-Peptid	CASP-3
AFC conj. IETD-Substrat-Peptid	CASP-8
AFC conj. LEHD-Substrat-Peptid	CASP-9

Wenn das AFC-Fluorochrom aufgrund der Peptidspaltung durch die Caspase frei wird, fluoresziert es bei einem Anregungslicht von 400 nm bei 505 nm. Diese Fluoreszenz wurde in einem *fluorescence microplate reader* gemessen. Dabei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Caspasenaktivität.

Für die Experimente wurden die Zellen in 6-*well*-Platten ausgesät, wobei immer zwei *wells* gleich behandelt wurden. Nach Versuchsende wurden die Proben mit dem zum *Kit* gehörenden *Lysis-Buffer* lysiert, zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend der Proteingehalt bestimmt. Pro Probe wurden je drei mal 100 µg Protein in *wells* einer 96-*well*-Platte pipettiert und mit *Lysis-Buffer* auf 50 µl Volumen aufgefüllt. Nachdem 1 M DTT im Verhältnis 1:10 dem *reaction buffer* 8 (*Kit*) zugegeben wurde, wurden die *wells* mit je 50 µl dieser Reaktionslösung beschickt. Als letztes wurde je 5 µl des spezifischen AFC conj. Substrates in die *wells* pipettiert und im Brutschrank eine Stunde inkubiert, bevor die Proben gemessen wurden.

Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der unbehandelten Kontrollen gleich 1 gesetzt, die Werte der behandelten Proben entsprechend als n-fache Aktivierung angegeben und über der

Behandlungsdauer aufgetragen.

2.2.10. Transfektion von Hepatomzellen

2.2.10.1. Transiente Transfektion von siRNA mit TransFectin

Mit Hilfe von siRNA für das *mcl-1*-Gen kann die MCL-1-Expression geblockt werden. Zur Transfektionskontrolle wurde siRNA gegen das nicht in den Hepatomzellen vorkommende *green fluorescence protein* (GFP)-Gen verwendet. TransFectin ist ein kationisches Lipid-Reagenz mit dem Ko-Lipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin.

Für die Versuche wurden die Zellen in 24-*well*-Platten ausgesät und am Folgetag mit siRNA transfiziert. Zunächst wurden zwei getrennte Lösungen jeweils mit siRNA und TransFectin in serumfreiem Medium hergestellt: Pro *well* einer 24-*well*-Platte wurde das TransFectin Reagenz mit 1 µl pro 50 µl Medium und die siRNA mit 1 µg pro 50 µl Medium eingesetzt. Dann wurden beide Lösungen vereinigt und 20 Minuten bei Raumtemperatur für die Bildung der reaktiven Komplexe aus siRNA und dem Lipid-Reagenz inkubiert. Danach wurden je 100 µl der Komplexlösung pro *well* auf die Zellen pipettiert und 24 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen 24 Stunden mit SC-58635 behandelt und die Apoptose mit der Nicoletti-Färbung in der FACS-Analyse gemessen. Unbehandelte Kontrollzellen wurden gleichzeitig ausgesät und parallel zu den Transfektionen und der SC-58635-Behandlung mit Leermedium behandelt.

2.2.10.2. Transiente Transfektion von cDNA mit FuGene 6

Zur Überexpression von MCL-1-Protein wurde die *mcl-1*-DNA-Sequenz (116), welche in einen pEF4-Vektor kloniert war und im Folgenden als *mcl-1*-cDNA (*complementary DNA*) bezeichnet wird, transfiziert. Zur Kontrolle für die Auswirkungen der Transfektion selbst wurde pEF4 als Leervektor benutzt.

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in 24-*well*-Platten ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde in serumfreiem Medium mit insgesamt 38 µl pro *well* wie folgt erstellt: Zu 36,48 µl Medium wurde zuerst vorsichtig 1,4 µl FuGENE-Reagenz zugegeben. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 0,38 µg *mcl-1*-cDNA einpipettiert, was einem Verhältnis von 3:1 FuGene zu DNA entsprach. Zur Komplexbildung von DNA und Reagenz wurde die Lösung erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf jedes *well* wurde nun je 38 µl Transfektionslösung vorsichtig getropft, die Platten leicht und vorsichtig geschwenkt und 24 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Danach

erfolgte die SC-58635-Behandlung entsprechend der Fragestellung des Experimentes. Die Kontrollzellen wurden mit Leervektor bzw. Leermedium parallel zur Transfektion und SC-58635-Zugabe mitbehandelt.

2.2.11. Adenovirale Transduktion

Die Infektion der Hepatomzellen wurde in der Größe *moi* (*multiplicity of infection*) angegeben. Dabei entsprach 1 *moi* einer infektiösen Einheit pro Zelle. Für die Berechnung war die Anzahl der Zellen bei Aussaat maßgeblich. Es wurde immer darauf geachtet, dass jede Virenkonzentration, z.B. 3 *moi* und 6 *moi* in einem gleichen Volumen, beispielsweise 50 μl , pro *well* zugegeben wurde. Nach vier Stunden Inkubationszeit unter den bereits beschriebenen Kulturbedingungen erfolgte ein Mediumwechsel. Am Folgetag wurden die infizierten Zellen für die jeweiligen Versuche verwendet.

In Vorversuchen wurde die am besten wirksame Konzentration Ad *fadd* Δ^- und Ad β -Gal ausstitriert. Hierfür wurden die Hepatomzellen mit 0,6 *moi*, 3 *moi* und 6 *moi* der jeweiligen Adenoviren infiziert. Am Folgetag wurde Apoptose mit SC-58635 induziert und nach 48 Stunden in der FACS-Analyse nach Nicoletti-Färbung gemessen (Abb. 16). Zur Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen parallel mitbehandelt. Als Kriterien für die Infektion mit Adenoviren ergaben sich folgende Punkte: Die Infektion selbst soll bei den mit

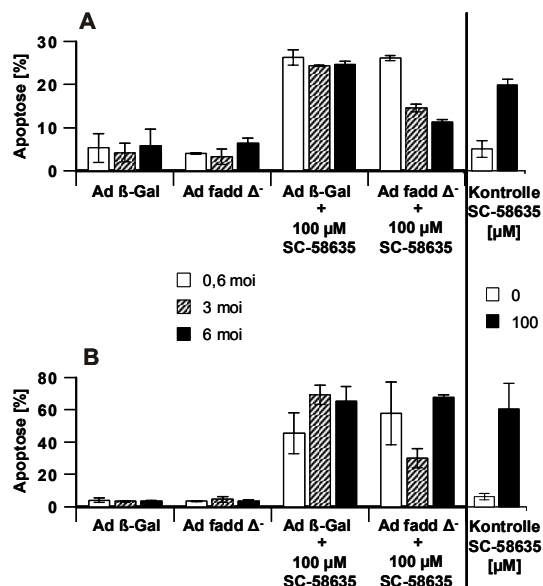


Abb. 16: Titration von Ad β -Gal und Ad *fadd* Δ^- . Verwendet wurden 0,6 *moi*, 3 *moi* und 6 *moi*. Die Zellen wurden in 24-*well*-Platten ausgesät und am Folgetag mit der entsprechenden Virenlast entsprechend infiziert. Vier Stunden nach Infektion erfolgte ein Mediumwechsel und am Folgetag wurden die Experimente begonnen. Die Behandlung aller Versuchsansätze dauerte 48 Stunden, danach wurde die Apoptose nach Nicoletti-Färbung in der FACS-Analyse bestimmt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Versuch, von insgesamt drei, mit jeweils drei Einzelproben. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

Kontrollviren infizierten Zellen keine signifikant höhere Grund-Apoptose auslösen als bei nicht infizierten Zellen. Außerdem sollte die SC-58635 induzierte Apoptose ebenfalls auf einem ähnlichen Niveau stattfinden wie bei den nicht infizierten Kontrollen. Weiterhin bestand die Annahme, dass FADD Δ^- antiapoptotisch wirkt (s. Kap. 1.8.2.), womit Ad FADD Δ^- idealerweise keine signifikant höhere Apoptose als die Kontrollviren auslösen sollte.

Abbildung 16 zeigt einen repräsentativen Versuch in HepG2- und HuH-7-Zellen. In HepG2-Zellen (Abb. 16A) zeigte sich für 6 moi tendenziell eine leicht erhöhte Apoptose der mit beiden Virentypen infizierten Zellen ohne SC-58635-Behandlung. In HuH-7-Zellen (Abb. 16B) war die Apoptose der mit 0,6 moi Ad β -Gal infizierten Zellen tendenziell reduziert. In beiden Zelllinien war demnach die den Kriterien entsprechende Konzentration bei 3 moi. Unter der Annahme, dass Ad FADD Δ^- antiapoptotisch wirkt (s. Kap. 1.8.2.), wurden zuletzt die 3 moi durch die deutliche Reduktion der Apoptose in beiden Zelllinien bestätigt. Somit wurden 3 moi für alle Versuche mit Ad FADD Δ^- und dem Kontrollvirus Ad β -Gal eingesetzt. In sämtlichen Experimenten mit Ad FADD Δ^- wurden zur Kontrolle Zellen mit Ad β -Gal identisch mitbehandelt.

2.2.12. Nachweise auf Proteinebene

2.2.12.1. Nukleäre und zytoplasmatische Proteinlysate

Nach dem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit TritonX-Puffer abgeschabt, in Reaktionsgefäße überführt und anschließend auf Eis 20 Minuten im Puffer inkubiert, damit die Zellen schwellen und aufbrechen. Im Anschluss wurden die Proben homogenisiert und 20 Minuten bei 4°C mit 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand stellt die zytoplasmatische Fraktion dar. Für die Proteinbestimmung wurden jeweils 10 μ l abgenommen und das übrige Lysat mit 5 x Probenpuffer versetzt, fünf Minuten bei 99°C denaturiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.12.2. Mitochondriale Proteinlysate

Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe des Lysepuffers für mitochondriale Proteine wurden die Zellen von der Schale abgeschabt, in Reaktionsgefäße überführt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Homogenisierung wurden die Lysate zehnmal mit einer 20 g-Nadel geschert. Im Anschluss wurden die Proben mit 750 g bei 4°C kurz zentrifugiert, um Kerne und nicht aufgebrochene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde weitere 25 Minuten mit 10.000 g bei 4°C zentrifugiert, wobei sich die mitochondriale

Fraktion im Pellet absetzte. Dies wurde nochmals mit demselben Puffer gelöst und gut durchmischt. Auch hiervon wurden 10 µl für die Proteinbestimmung zurückgehalten. Zur Aufbewahrung wurden die Proben aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.12.3. Gesamtproteinlysate

Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit dem Lysepuffer für Gesamtproteinlysate abgeschabt. Damit die Zellen aufbrechen, wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach zwei Gefrier- und Auftauzyklen wurden die Lysate bei 16.000 g eine Minute zentrifugiert und der aliquotierte Überstand für die Proteinbestimmung und die Western-Blotanalyse weiterverwendet bzw. bei -20°C gelagert.

2.2.12.4. Proteinbestimmung

Als Färbereagenz wurde eine saure Protein-*Assay*-Lösung auf der Basis von Coomassie-Brillant-Blue G-250 verwendet. Bindet der Farbstoff an Protein, ändert sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Lösung war fünffach konzentriert und wurde 1:5 mit H₂O verdünnt. Zu 5 ml Reagenz wurden 100µl BSA (bovines Serum-Albumin)-Standard bzw. 10 µl Probe plus 90 µl H₂O zugegeben. Die Extinktionswerte der Doppelproben wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm als optische Dichte (OD) bestimmt und der Mittelwert errechnet. Für jede Proteinbestimmung aus den Versuchen wurde eine Eichkurve, welche die optische Dichte über dem Proteingehalt der BSA-Standards darstellt, aufgestellt (s. Abb. 17). Aus der Steigung der Eichgeraden und den Messwerten der Proben wurde der entsprechende Proteingehalt jeder Probe ermittelt.

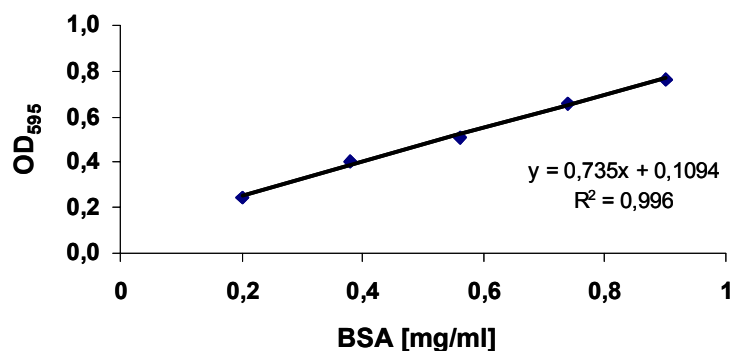


Abb. 17: Beispiel für eine Protein-Eichgerade. Die Extinktionswerte bei 595 nm wurden über der jeweiligen BSA-Protein-Konzentration [mg/ml] aufgetragen. Das Excel-Programm errechnete die Steigung mit $y = 0,735x + 0,1094$. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt die Genauigkeit der Steigungsgeraden an. Je genauer die Messpunkte getroffen werden, desto besser nähert sich $R^2 = 1$.

2.2.12.5. Western-Blotanalyse

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden SDS-Gele mit einem unterschiedlich hohen Acrylamidanteil verwendet. Für kleine Proteine bis 20 kDa 15 %, für 30 bis 40 kDa große Proteine 12 %, ab 50 kDa 10 % Acrylamid. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben auf 20 µg Proteingehalt eingestellt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 10 µl verdünnt. Dem wurden 2,5 µl fünffach Probenpuffer zum Beschweren der Proben hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Proteine 5 Minuten bei 99° denaturiert. Die so entfalteten einzelsträngigen Proteine wandern ihrer Größe entsprechend durch das Gel. Je kürzer die Stränge sind, desto weiter laufen sie durch das Gel und werden später im unteren Bereich sichtbar.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit Laufpuffer so weit aufgefüllt wurde, bis die Gele leicht bedeckt waren. Dann wurden die Geltaschen mit je 12 µl pro Probe beladen, entsprechende Proteinkontrollen und ein Größenmarker wurden ebenfalls in die angrenzenden Taschen einpipettiert. An die Apparatur wurde zunächst eine Stromstärke von 15 mA angelegt, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Die Separation der Proteine im Trenngel erfolgte über Nacht bei einer Stromstärke von 30 mA. Wenn die blau gefärbte Probenfront den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde die Apparatur abgeschaltet und die Trenngele in Transferpuffer von den Glasplatten abgelöst.

Immunoblot

Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden im Anschluss auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurde die Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und zwei Minuten in Methanol eingelegt. Whatmanpapier derselben Größe wurde in Transferpuffer getränkt. Im Anschluss wurde ein Sandwich aus fünf Lagen Whatmanpapier, der Membran, dem Gel und nochmals fünf Lagen Whatmanpapier gestapelt. Etwaige Luftblasen wurden vorsichtig mit einer Pipette ausgerollt. Der Proteintransfer erfolgte in der Semi-dry-Blotkammer mit 1 mA pro cm² für 1,5 Stunden.

Zur Überprüfung, ob die Proteine gleichmäßig auf die Membran transferiert wurden, wurden sie im Ponceau-S-Färbe-Bad optisch dargestellt. Für die weitere Detektion wurden die Membranen mit Aqua dest. gewaschen und für 1,5 Stunden in der Blockierungslösung leicht geschüttelt. Die nun folgende Erstantikörperinkubation wurde unter leichtem Schütteln abhängig vom jeweiligen Antikörper in unterschiedlichen Puffern, über Nacht bei 4°C oder

für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Folgende Erstantikörper wurden verwendet, ihre jeweilige Verdünnung steht in Klammern:

PBST-Puffer, Raumtemperatur, zwei Stunden: CASP-8 (1:4).

TBST-Puffer, 5 % BSA, Raumtemperatur, eine Stunde: Aktin (1:5.000).

TBST-Puffer, 5 % Magermilchpulver, 4°, über Nacht: Bax (1:1.000), Cytochrom-c-Oxidase (1:1.000), COX-2 (1:1.000), CYT-C (1:1.000), EP1 (1:500), EP2 (1:500).

TBST-Puffer, 5 % BSA, 4°, über Nacht: Bid (1:1.000), MCL-1 (1:1.000).

Danach wurden die Membranen dreimal in TBST gewaschen und mit dem entsprechenden HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierten Zweitantikörper unter sanftem Schütteln eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiefür wurden die folgenden Puffer für die entsprechenden Zweitantikörper mit 5 % Magermilchpulver versetzt. In Klammern sind die jeweiligen Erstantikörper angegeben:

PBST-Puffer, Verdünnung 1:20.000: Anti-Mouse IgG2b (CASP-8 und CYT-C).

TBST-Puffer, Verdünnung 1:10.000: Anti-Mouse IgM (Aktin).

TBST-Puffer, Verdünnung 1:2.500: Anti-Mouse IgG (Cytochrom-c-Oxidase).

TBST-Puffer, Verdünnung 1:2.000: Anti-Rabbit (BAX, BID und MCL-1).

enhanced chemiluminescence (ECL)

Vor der Signaldetektion in der Dunkelkammer wurden die Membranen wiederum dreimal zehn Minuten mit TBST oder PBST, entsprechend dem Puffer für die zweite Antikörperinkubation, gewaschen. Puffer 1 und 2 für die ECL wurden zusammengeführt und sofort für exakt eine Minute auf die Membran gegeben. Dabei wird die Oxidation von Luminol durch die Peroxidase katalysiert. Das entstehende Licht liegt im Bereich der Sensitivität blauempfindlicher Standard-Röntgenfilme. Diese wurden in einer Röntgenfilmkassette 30 Sekunden, zwei und drei Minuten lang belichtet und in der Entwicklermaschine entwickelt.

Erneute Inkubation der Membranen

Insgesamt wurden die Membranen höchstens dreimal mit Antikörpern inkubiert. Eine Detektion erfolgte zur Kontrolle der Proteinbeladung immer mit Aktin bzw. Cytochrom-c-Oxidase. Bei der Auswahl der Erstantikörper wurde, wenn möglich, eine Überschneidung hinsichtlich der Proteingröße und/oder der Zweitantikörper vermieden. Im Falle von unvermeidbaren Überschneidungen wurden die Membranen vor einer erneuten Inkubation mit der Re-Blot-Plus-Lösung (*Strong Antibody Stripping Solution*) 15 bis

25 Minuten nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll gereinigt. Im Anschluss wurde die Membran eine Stunde in Blockierungspuffer sanft geschüttelt. Danach konnte ein erneuter Inkubationszyklus mit Erst- und Zweitantikörper durchgeführt werden.

Auswertung der Bandenstärke, Densitometrie

Die Röntgenfilme wurden zunächst mit Hilfe eines Durchlichtskanners digitalisiert und die Banden anschließend mit der *Software* AlphaEaseFC 4.0 für Windows vermessen. Die ermittelte Bandendicke und Intensität der Schwarzfärbung wurde als Zahlenwert dargestellt. Für die Ermittlung der tatsächlichen Konzentration der detektierten Proteine wurden die Zahlenwerte auf eine gleiche Ladekontrolle, welche mit Aktin bzw. Cytochrom-c-Oxidase durchgeführt wurde, angeglichen. Dafür wurde der Zahlenwert für die Ladekontrolle der unbehandelten Probe (Ladekontrolle $1_{\text{unbehandelte Probe}}$) jeweils durch den Zahlenwert der Ladekontrolle N der weiteren Proben geteilt. Dadurch wurde für jede auszuwertende Proteinbande (A_N) der Faktor (F_N) ermittelt, mit dem ihr Zahlenwert zum Ausgleich des Aktinanteils multipliziert wurde:

$$(1) \text{ Ladekontrolle } 1_{\text{unbehandelte Probe}} / \text{Ladekontrolle N} = \text{Faktor N (} F_N \text{)}$$

Die Multiplikation des Faktors (F) mit dem Zahlenwert der entsprechenden auszuwertenden Proteinbande (A) ergab den aktinbereinigten Zahlenwert (B):

$$(2) F_N \times A_N = B_N$$

Für die graphische Darstellung wurde B_1 (unbehandelte Kontrolle) gleich 1 (C_1) gesetzt und die Werte der behandelten Proben entsprechend angeglichen (C_N) mit

$$(5) B_1 / B_N = C_N$$

Die Werte für C_N wurden unter den jeweiligen Proteinbanden als Balkendiagramm dargestellt.

2.2.13. Statistische Analysen

Generell wurden sämtliche in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wenigstens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Aus den jeweiligen Einzeldaten der Behandlungen wurden die Mittelwerte mit der Standardabweichung SD ermittelt. Als Prüfverfahren für die statistische Signifikanz wurden der Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test* (GraphPad) für den Vergleich der Mittelwerte unterschiedlicher Behandlungen zueinander und ANOVA (SAS und Graphpad) für die statistisch signifikante Änderung eines Kurvenverlaufes z.B. über die Zeit (Zeiteffekt) durchgeführt. Ein Vergleich von zwei Kurvenverläufen mit unterschiedlicher Behandlung über die Zeit, z.B: Zeiteffekt und SC-58635-Effekt für Kurve I verglichen mit Zeiteffekt und Bleomycineffekt für Kurve II, wurde mit der multivarianten ANOVA (SAS) analysiert. Synergistische Effekte, nach Chou und Talalay (224) zwischen der SC-58635 Behandlung und chemotherapeutischen Behandlung wurden mit einer balancierten *two-way* ANOVA (SAS) getestet (z.B. Abb. 52). Die statistischen Tests mit der SAS-Software wurden freundlicherweise von PD Dr. T. Schilling, Innere Medizin I, Universitätsklinikum Heidelberg, durchgeführt. Die Anwendung des Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test* (GraphPad-Software) wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. W. Lehmacher, Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Epidemiologie, Universität Köln, für die in der Arbeit relevanten Fragestellungen bestätigt.

Anmerkung: In der Publikation Kern et al. (195) wurden folgende Abbildungen aus den Ergebnissen eines einzigen Experimentes stellvertretend für drei durchgeführte Experimente gezeigt: *Fig. 3 B* und *C* auf S. 7062 und *Fig. 5 D* auf S. 7064. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Versuche mit Ergebnissen aus mehreren Experimenten gemittelt dargestellt, so dass dadurch die Mittelwerte und Standardabweichungen etwas unterschiedlich ausfallen. Dies betrifft Abb. 47 (korrespondierend zu *Fig. 3 B* der Publikation), Abb. 43 (*Fig. 3 C* der Publikation) und Abb. 37 (*Fig. 5 D* der Publikation). Die Grundaussage der jeweiligen Experimente bleibt jedoch unverändert. Abb. 22 und 23 dieser Arbeit berücksichtigen eine Zeitspanne von zwölf bis 72 Stunden. Für die Vergleichbarkeit der Experimente wurden die Grundwerte der unbehandelten Kontrollen gleich 2,5 % gesetzt und Daten aus jeweils 2 Experimenten gemittelt. In der Publikation Kern et al. (195) entsprechen diese beiden Abbildungen *Fig. 2 A*, welche die Mittelwerte aus drei Experimenten mit dem Grundwert 5 % wiedergibt. Auch hier ergeben sich ungeachtet der voneinander abweichenden Darstellung keine Änderungen in der Grundaussage der Versuche.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der Cyclooxygenase-2 in Hepatom-Zellen

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird in gesunden Zellen nicht konstitutiv exprimiert, sondern nur, beispielsweise bei inflammatorischen Prozessen, induziert (15, 16). Die in der Arbeit verwendeten HCC-Zelllinien HuH-7 und HepG2 zeigten unbehandelt eine deutliche basale COX-2-Expression. Immunzytologisch kann COX-2 vor allem im perinukleären Zytoplasma dargestellt werden (Abb. 18A). Im Vergleich zu T47D, einer Mammakarzinomzelllinie mit sehr schwacher COX-2-Expression, ergab die Western-Blotanalyse eine bis zu mehr als vierfach höhere Intensität der COX-2-Banden in den HCC-Zelllinien (Abb. 18B).

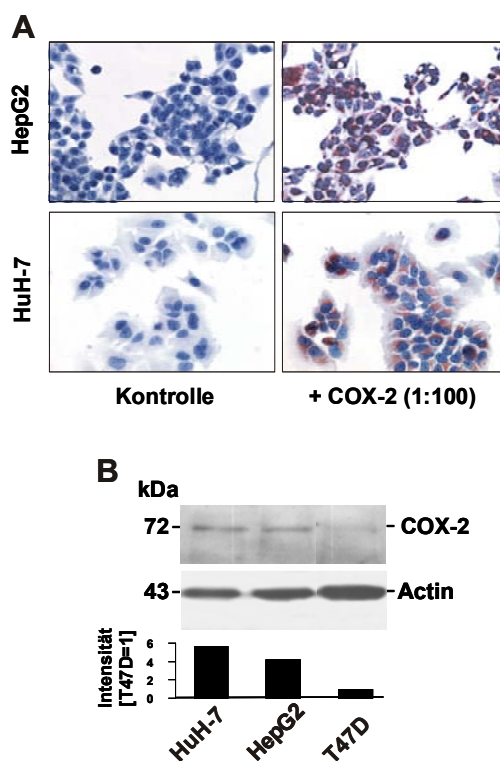


Abb. 18: Expression von COX-2 in HepG2- und HuH-7-Zellen. **A:** Immunzytologie für COX-2 in HepG2- (oben) und HuH-7-Zellen (unten). Der COX-2-Antikörper wurde 1:100 verdünnt eingesetzt. Die Kontrolle erfolgte durch Inkubation ohne Erstantikörper. Die zytoplasmatische Immunreaktivität für COX-2 zeigte sich vor allem im perinukleären Zytoplasma. **B:** Western-Blotanalyse der COX-2-Proteinexpression. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Aktin und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei die COX-2-Expression von T47D = 1 gesetzt wurde ([T47D = 1]).

Damit konnte die konstitutive Expression von COX-2, dem Zielprotein des selektiven COX-2-Inhibitors SC-58635, in den Hepatomzellen demonstriert werden.

PGE₂, ein Endprodukt des Prostaglandinstoffwechsels steuert COX-2 abhängig als Ligand spezifisch Prostaglandinrezeptoren (EP1 bis EP4) an, wodurch der ERK-Signalweg zur Angiogenese, oder der PI3K/AKT-Weg zur Proliferation und zur weiteren Induktion der COX-2 über *second messenger* aktiviert werden können (21). Zudem ist die Weiterleitung antiapoptotischer Signale über PI3K/AKT in die Tumorgenese involviert (21, 225).

Die Western-Blotanalyse zeigte eine basale Expression der Rezeptoren EP1 und EP2 in beiden unbehandelten Zelllinien (HepG2, HuH-7) (Abb. 19).

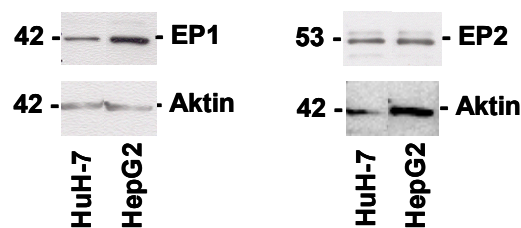


Abb. 19: Expression der Prostaglandinrezeptoren EP1 und EP2 in HepG2- und HuH-7-Zellen. Western-Blotanalyse der EP1 (links)- und EP2 (rechts)-Proteinexpression.

So konnte ergänzend zur COX-2-Expression auch die Expression der Prostaglandinrezeptoren EP1 und EP2 in den untersuchten Hepatomzellen gezeigt werden (vgl. dazu auch (226)).

3.2. SC-58635 vermittelte Apoptoseinduktion

Zunächst wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 auf die relative Lebendzellzahl (Zellvitalität) mittels MTT-Test zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft. Dazu wurden die Hepatom-Zellen mit 10, 25, 50, 100, 200 und 400 μM SC-58635 jeweils 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Zusätzlich wurde eine mögliche apoptotische Wirkung von DMSO, dem Lösungsmittel für SC-58635, in der maximalen Konzentration von 0,8 %, was einer Behandlung mit 400 μM SC-58635 entspricht, kontrolliert.

SC-58635 führte in beiden Zelllinien zu einer dosis- und zeitabhängigen Reduktion der vitalen Zellzahl. Ab zwölf Stunden Behandlung induzierten 100 μM SC-58635 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Reduktion der Zellvitalität von HepG2- und HuH-7-Zellen (Abb. 20 u. 21). Die DMSO-Kontrolle mit der vierfachen DMSO-Konzentration einer 100 μM -SC-58635-Lösung zeigte erst nach 48 Stunden (Abb. 20D u. 21D) eine gewisse Zytotoxizität.

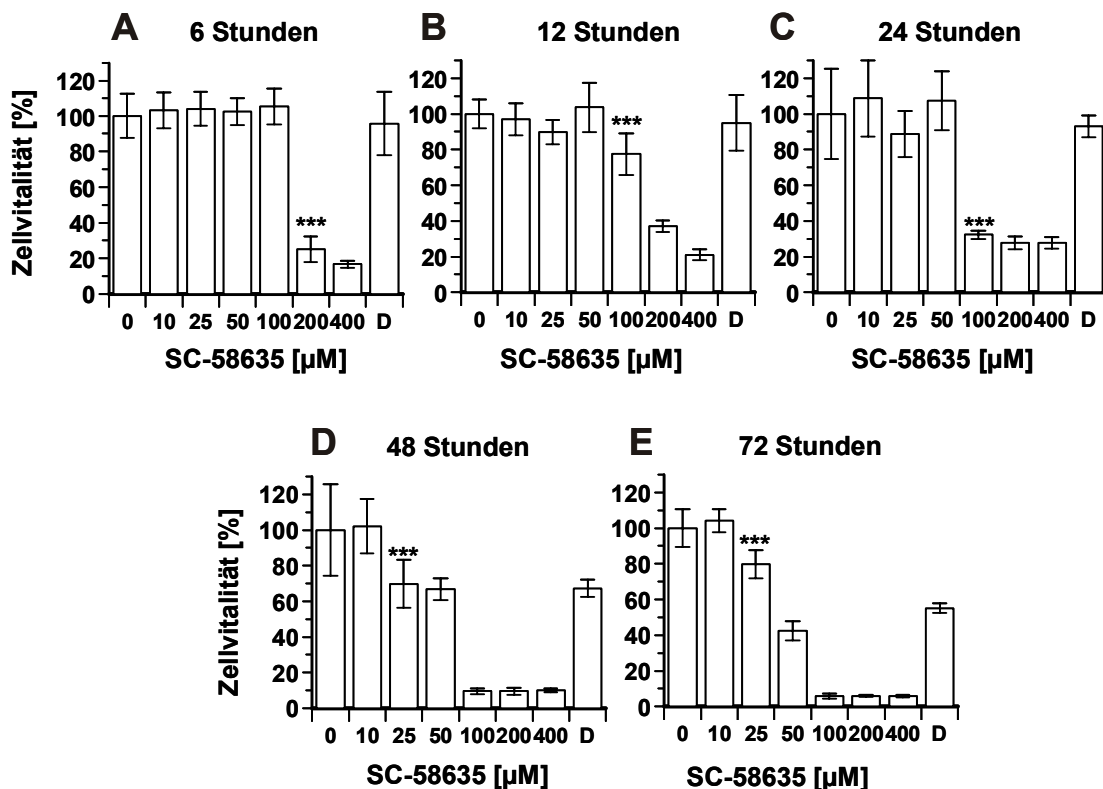


Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 gemessen an der relativen Anzahl lebender HepG2-Zellen (Zellvitalität). HepG2-Zellen wurden mit 0, 10, 25, 50, 100, 200 und 400 μM SC-58635 behandelt. D bezeichnet die Maximalkonzentration des Lösungsmittels DMSO (0,8 %) bei 400 μM SC-58635. **A:** 6 Stunden. **B:** 12 Stunden. **C:** 24 Stunden. **D:** 48 Stunden. **E:** 72 Stunden. In der Auswertung wurden jeweils zwei Experimente pro Zeit mit je $n = 6$ pro Konzentration berücksichtigt. Der Mittelwert der unbehandelten Kontrolle wurde auf jeweils 100 % gesetzt. In der statistischen Auswertung (Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*) wurde jeweils der erste Mittelwert mit einem signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Dabei entsprechen *** $P < 0,001$.

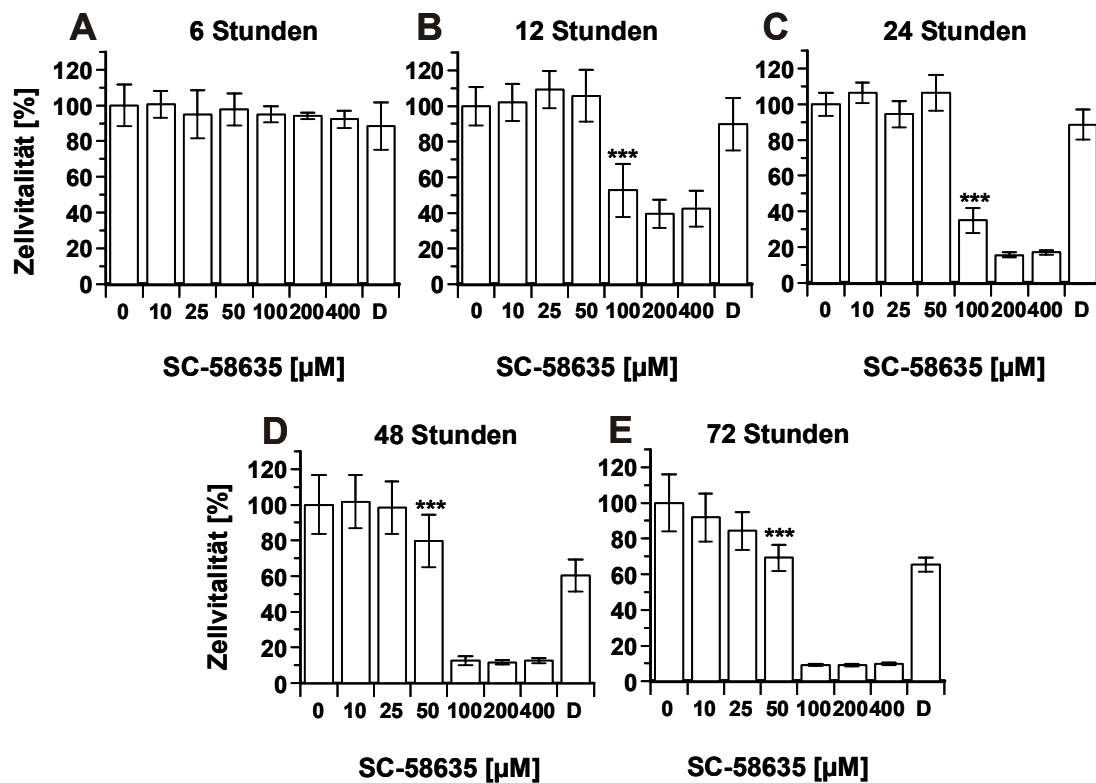


Abb. 21: Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 gemessen an der Zellvitalität (relative Anzahl lebender Zellen) von HuH-7-Zellen. Die Behandlung der Zellen und Auswertung der Experimente erfolgte wie in Abb. 20 beschrieben. **A:** 6 Stunden. **B:** 12 Stunden. **C:** 24 Stunden. **D:** 48 Stunden. **E:** 72 Stunden. *** $P < 0,001$.

Die Abnahme der Zellvitalität ist jedoch nur ein allgemeiner Hinweis auf eine Zellschädigung, welche beispielsweise auf Nekrose oder Apoptose zurückgeführt werden kann. Bei der therapeutischen Anwendung von SC-58635 soll zur Schonung des Organismus bevorzugt eine Apoptose der Krebszellen erreicht werden. Im Gegensatz dazu würden bei einem nekrotischen Absterben der Zellen verstärkt inflammatorische Prozesse im umliegenden Gewebe induziert werden.

Die Apoptoseexekution durch selektive COX-2-Blockade mit SC-58635 wurde mit Hilfe der Nicoletti-Färbung näher spezifiziert (Abb. 22 u. 23). Hierbei wurden die Zellmembranen mit Nicoletti-Puffer für Propidiumjodid, das sich in die DNA einlagert, durchlässig gemacht. Wird die DNA bei Apoptose degradiert, kann sich der Farbstoff zunehmend schlechter einlagern und die Färbung wird schwächer. In der FACS-Analyse wurden die schwächer gefärbten, apoptotischen Zellen in der Auswertung als Apoptose [%] dargestellt.

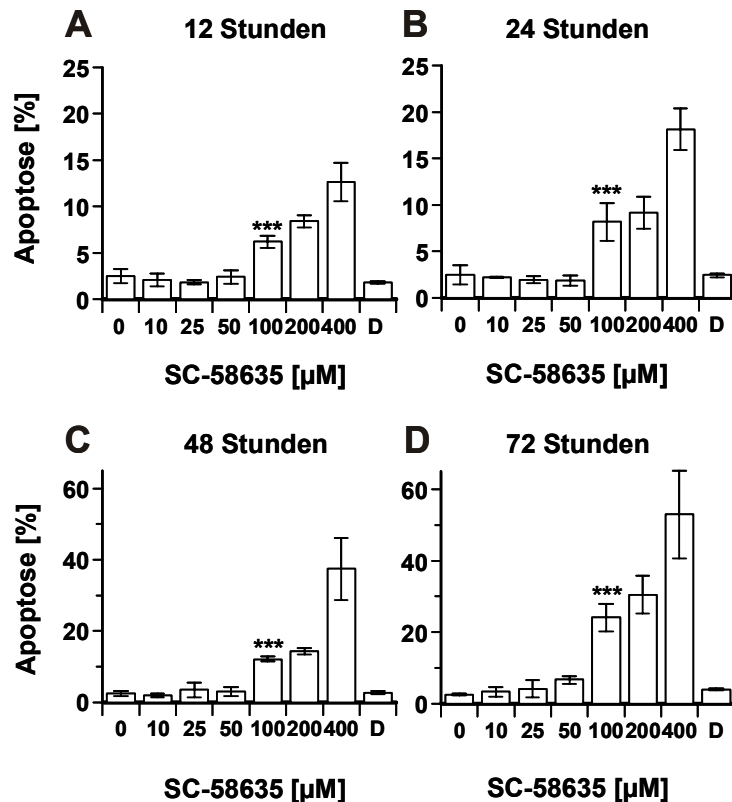


Abb. 22: Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 (0, 10, 25, 50, 100, 200 und 400 µM) auf die relative Anzahl der Apoptoseereignisse (Nicoletti-Färbung) in HepG2-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. D bezeichnet die Maximalkonzentration DMSO (0,8 %) bei 400 µM SC-58635. **A:** 6 Stunden. **B:** 12 Stunden. **C:** 24 Stunden. **D:** 48 Stunden. **E:** 72 Stunden. In der Auswertung wurden jeweils zwei Experimente mit je n = 3 pro Konzentration berücksichtigt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der Mittelwert der jeweils unbehandelten Kontrolle auf 2,5 % gesetzt. In der statistischen Auswertung (Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*) wurde jeweils der erste Mittelwert mit einem signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (0 µM SC-58635) angegeben. Dabei entsprechen *** $P < 0,001$.

Wie in den MTT-Tests wurde auch bei der Apoptoseexekution eine dosis- und zeitabhängige Wirkung von SC-58635 beobachtet (Abb. 22 u. 23). Damit konnte die Abnahme der Zellvitalität auf eine apoptotische Wirkung durch selektive COX-2-Blockade zurückgeführt werden. Wie bei den Vitalitätstests lag auch hier in beiden Zelllinien die wirksamste Konzentration ab zwölf Stunden bei 100 µM SC-58635 (Abb. 22A u. 23A). DMSO selbst hatte keinen Einfluss auf die Apoptose.

Mittels DAPI-Färbung von HepG2- und HuH-7-Zellen wurde die Apoptose nach 48 Stunden 100 µM SC-58635-Behandlung morphologisch dargestellt. In Abb. 24 ist kondensiertes Chromatin, ein Merkmal von apoptotischen Veränderungen, in den Zellkernen der behandelten Zellen anhand der leuchtend hellblauen Färbung zu erkennen.

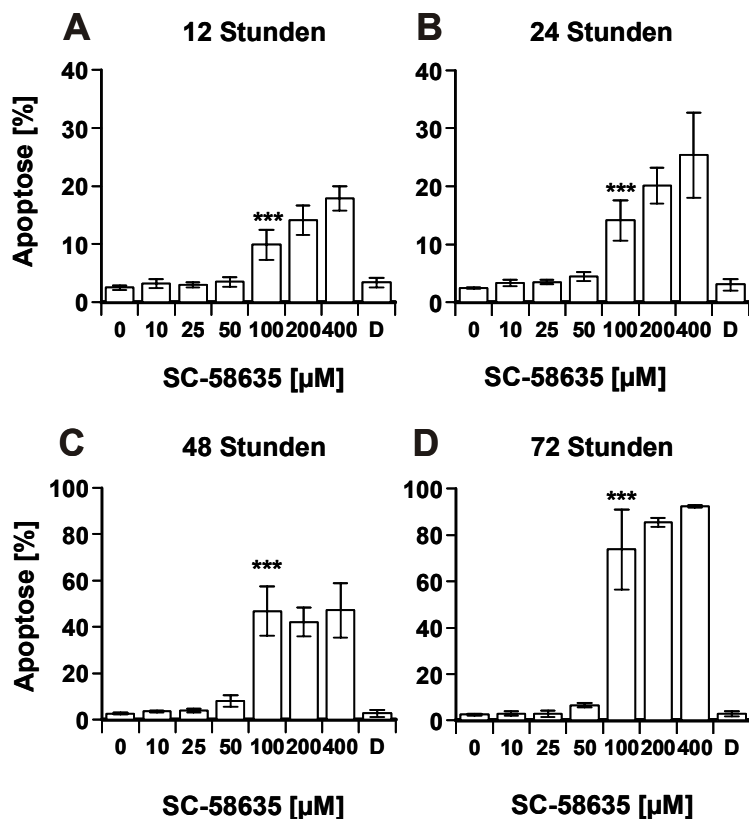


Abb. 23: Dosis-Wirkungs-Beziehung von SC-58635 (0, 10, 25, 50, 100, 200 und 400 µM) auf die relative Anzahl der Apoptoseereignisse (Nicoletti-Färbung) in HuH-7-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Behandlung und Auswertung der Experimente entspricht der Beschreibung zu Abb. 22. **A:** 6 Stunden. **B:** 12 Stunden. **C:** 24 Stunden. **D:** 48 Stunden. **E:** 72 Stunden. *** $P < 0,001$.

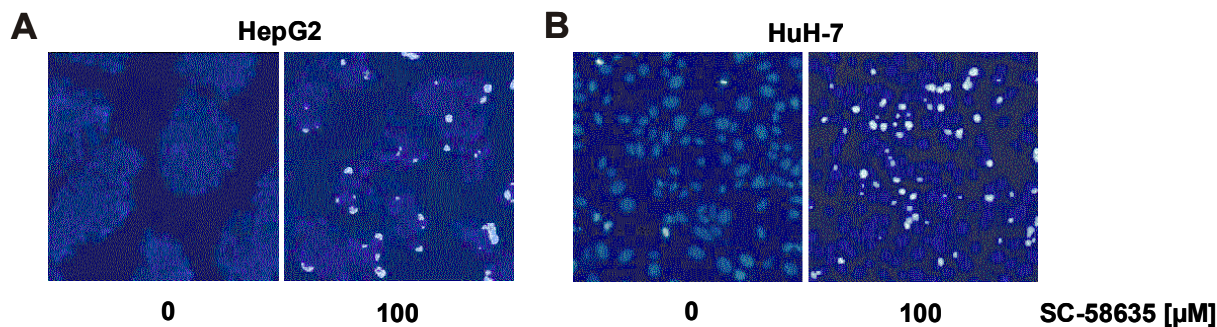


Abb. 24: DAPI-Färbung der mit SC-58635 behandelten Zellen nach 48 Stunden. Kondensiertes Chromatin ist in den apoptotischen Zellen nach Anregung des Farbstoffes im UV-Bereich leuchtend blau gefärbt. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

Zusammenfassend konnte belegt werden, dass die selektive COX-2-Inhibition mit SC-58635 in den untersuchten HCC-Zelllinien Apoptose auslöst. Aufgrund der Ergebnisse aus den MTT-Tests und den Nicoletti-Färbungen wurde in der vorliegenden Arbeit für die weiteren Untersuchungen, wenn nicht anders erwähnt, 100 µM SC-58635 als Standardkonzentration verwendet.

3.3. Aktivierung von Caspasen während der selektiven COX-2-Blockade durch SC-58635

Caspasen leiten in erster Linie Apoptosesignale in der Zelle weiter (84). Dazu zählen die Initiator-Caspasen CASP-2, -8, -9 und -10 und die Effektor-Caspasen CASP-7, -3 und -6 (83). Im Falle der Apoptoseexekution, wie sie nach selektiver COX-2-Blockade gezeigt wurde, sollte dementsprechend die Aktivität von Caspasen nachweisbar sein. Gleichzeitig kann über die Identifizierung der beteiligten Caspasen eine erste Eingrenzung der beschriebenen Signalwege erfolgen. So steht die *upstream* gelegene CASP-8, welche am DISC-Komplex aktiviert wird (92), stellvertretend für den extrinsischen Signalweg. Dagegen gibt eine mögliche Beteiligung der am Apoptosom rekrutierten CASP-9 (93) einen Hinweis auf die Aktivierung des intrinsischen Signalweges über die Mitochondrien. Die *downstream* gelegene Effektor-CASP-3 stellt einen Knotenpunkt, an dem der ex- und intrinsische Signalweg zusammentreffen, dar (83, 84). Zudem bestätigt ihre Aktivierung generell die Beteiligung der Caspasen und zeigt auch die Weiterleitung des Apoptosesignals an den Nukleus an (86, 87).

Auf dieser Grundlage wurden CASP-8, CASP-9 und CASP-3 auf ihre mögliche Aktivierung nach selektiver COX-2-Inhibition hin untersucht. Dieser Test erfolgte über die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der CASP-3, CASP-8 und CASP-9 über ihre entsprechenden mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Spaltprodukte. Dabei entsprach der CASP-3-Aktivierung die Spaltung des DEVD-AFC-Substrates, der CASP-8-Aktivierung die Spaltung des IETD-AFC-Substrates und der CASP-9-Aktivierung die Spaltung des LEHD-AFC-Substrates. Die erste Messung erfolgte bereits nach zwei Stunden, da in früheren Studien eine rasche Spaltung von CASP-3 und CASP-9 gezeigt werden konnte (45). Die zweite Messung erfolgte in Anlehnung an die Apoptosestudien und Zellvitalitätstest nach 24 Stunden.

Der Aktivierungstest ergab eine erhöhte enzymatische Aktivität der CASP-3, CASP-8 und CASP-9 nach selektiver COX-2-Blockade in HepG2-Zellen (Abb. 25). Dabei wurden die beiden Initiator-Caspasen in den ersten zwei Stunden am stärksten aktiviert (Abb. 25B und C). Die Spaltprodukte der Effektor-Caspase-3 nahmen am stärksten von zwei bis 24 Stunden SC-58635 Behandlung zu (Abb. 25A). Auch in HuH-7-Zellen wurden CASP-3, CASP-8 und CASP-9 aktiviert, wobei alle drei Caspasen innerhalb der ersten zwei Stunden nach selektiver COX-2-Blockade am aktivsten waren (Abb. 26).

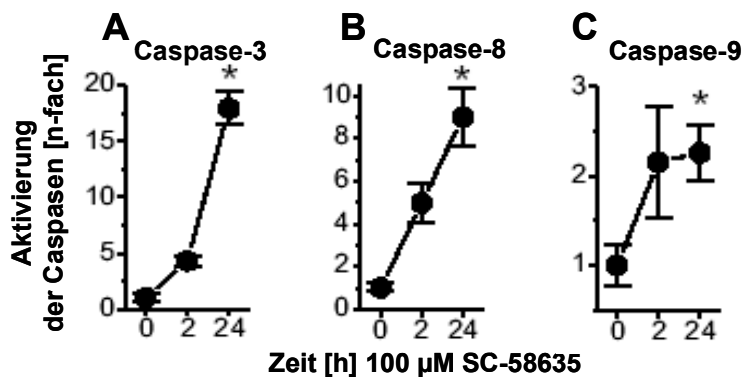


Abb. 25: Nachweis der erhöhten (n-fach) enzymatischen Aktivität der Caspasen in HepG2-Zellen nach zwei und 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 μM). Das bei der Spaltung der jeweils spezifischen, mit AFC gekoppelten, Caspasensubstrate freigesetzte Fluorochrom wurde fluorimetrisch bei 505 nm bestimmt. **A:** vier- und 18-fache Aktivierung der CASP-3 entsprechend der Spaltung des DEVD-AFC Substrates. **B:** fünf- und neunfache Aktivierung der CASP-8 entsprechend der Spaltung des IETD-AFC Substrates. **C:** zweifache Aktivierung der CASP-9 entsprechend der Spaltung von LEHD-AFC. Dargestellt wurden die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils n = 3. Die statistische Auswertung des Zeiteffektes (Kurvenverlauf) erfolgte mittels ANOVA,* entspricht $P < 0,0001$.

In beiden Zelllinien bewirkte also die selektive COX-2-Blockade die Spaltung der CASP-3, Casp-8 und Casp-9 (Abb. 25 und 26).

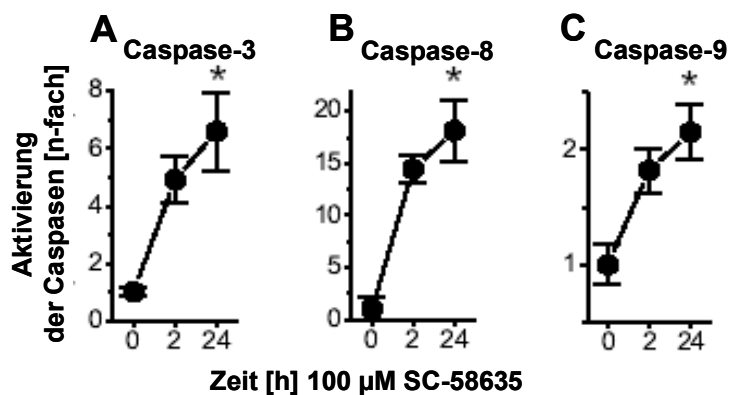


Abb. 26: Nachweis der erhöhten (n-fach) enzymatischen Aktivität der Caspasen in HuH-7 nach zwei und 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 μM). Die Beschreibung und statistische Auswertung entspricht der Beschreibung zu Abb. 25. **A:** fünf- und siebenfache Aktivierung der CASP-3 entsprechend der Spaltung des DEVD-AFC Substrates. **B:** 14- und 18-fache Aktivierung der CASP-8 entsprechend der Spaltung des IETD-AFC Substrates. **C:** 1,8- bis 2,1-fache Aktivierung der CASP-9 entsprechend der Spaltung von LEHD-AFC. * entspricht $P < 0,0001$.

Dieses Ergebnis wurde in einem funktionellen Test mit der Inhibition der jeweiligen Caspasen unter Verwendung der folgenden Inhibitoren weiter verifiziert: genereller Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK (ZVAD), CASP-3-Inhibitor (C3I), CASP-8-Inhibitor (C8I), sowie CASP-9-Inhibitor (C9I). Nach zwölf Stunden Vorbehandlung mit den aufgeführten Inhibitoren wurde mit SC-58635 Apoptose induziert und diese nach 24 Stunden gemessen. In

beiden Zelllinien führte die Inhibition der Caspasen bei gleichzeitiger SC-58635-Behandlung zu einer signifikanten ($P < 0,05$) Apoptosereduktion (Abb. 27), womit die Aktivierung der CASP-8, CASP-3 und CASP-9 bei der SC-58635 induzierten Apoptose funktionell bestätigt werden konnte.

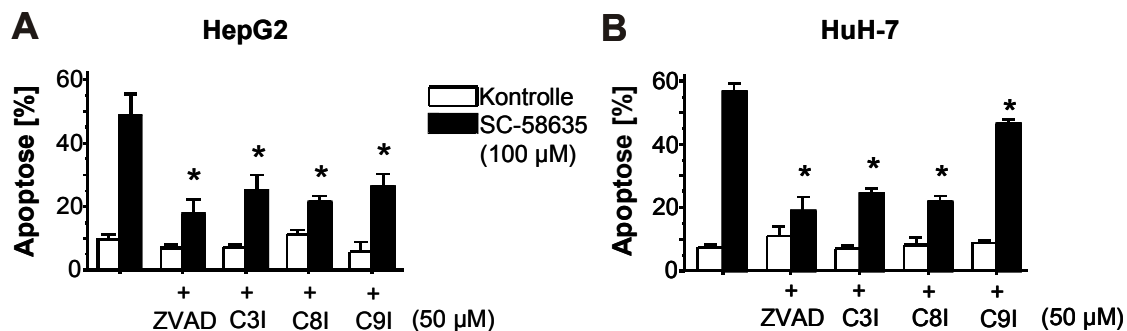


Abb. 27: Funktioneller Nachweis der Caspasenbeteiligung an der SC-58635 vermittelten Apoptose. Die Zellen wurden zwölf Stunden mit jeweils 50 µM des entsprechenden Caspaseinhibitors (CI) vorbehandelt, nach Zugabe von 100 µM SC-58635 wurde nach 24 Stunden die Apoptose mittels Nicoletti-Färbung gemessen. **A:** HepG2 **B:** HuH-7. Die statistische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils $n = 3$ erfolgte mit dem *Wilcoxon's Test*, * entsprechen $P < 0,05$. Verglichen wurden die Werte der Kombinationsbehandlung mit der SC-58635-Behandlung (100 µM).

Bei ihrer Aktivierung werden die Caspasen durch proteolytische Spaltung der Pro-Caspase in kleinere Untereinheiten getrennt (84), welche auf Proteinebene gezeigt werden können. In Vorarbeiten wurde bereits die frühe Spaltung der CASP-3 und CASP-9 in der Western-Blotanalyse belegt (45). Zur Ergänzung wurde die Rekrutierung der aktiven großen Untereinheit (41/42 kDa) und der Gehalt der Initiator-Caspase-8 mit voller Länge (55/57 kDa) in der Western-Blotanalyse dargestellt (227). Der bisher gewählte kleinste Zeitraum von zwei Stunden selektiver COX-2-Blockade wurde nun in weitere kleinere Zeiteinheiten (fünf und 30 Minuten, sowie eine Stunde) als Kinetik der Caspasenspaltung erfasst. Dies zeigt mögliche frühe Schritte der durch SC-58635 ausgelösten Apoptoseexekution weit vor der messbaren Apoptose ab zwölf Stunden Behandlungsdauer.

In HepG2-Zellen war die Konzentration der aktiven Untereinheit der CASP-8 bereits fünf Minuten nach SC-58635-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt (Abb. 28A) und nach einer Stunde verdreifacht. Der Gehalt der vollen Länge der Pro-Caspase entsprach in etwa dem Kontrollwert. In HuH-7-Zellen nahm der Gehalt der Spaltprodukte ab Behandlungsbeginn kontinuierlich auf das fünffache des Fünf-Minuten-Wertes zu, während der Gehalt der Pro-Caspase auf Höhe des Kontrollwertes blieb (Abb. 28B).

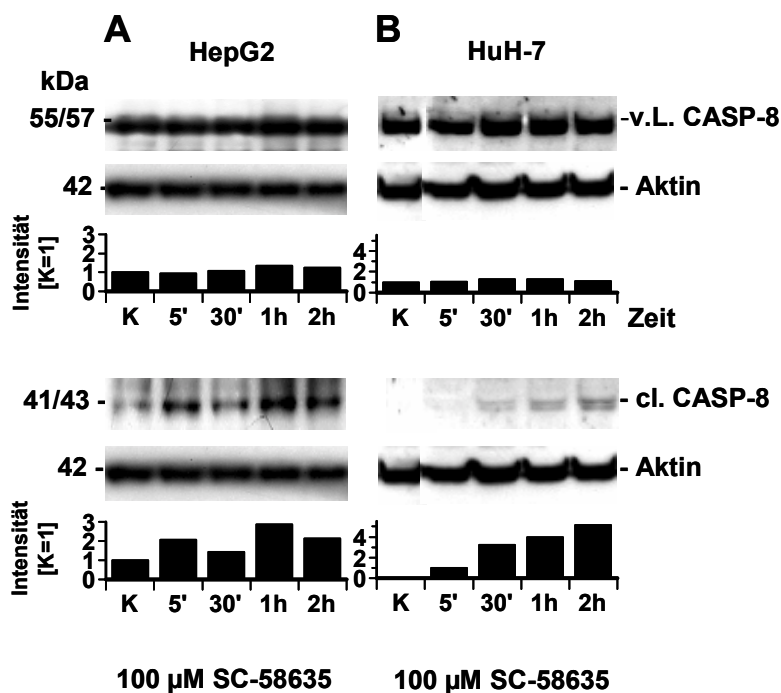


Abb. 28: Aktivierung der CASP-8 in HepG2- und HuH-7-Zellen während fünf Minuten bis 2 Stunden SC-58635-Behandlung (100 µM). Western-Blotanalyse der Gesamtproteinlysate für die volle Länge (v.L.) der Pro-Caspase-8 bei 55/57 (oben) und die gespaltene aktive große Untereinheit (cl. CASP-8) bei 41/43 kDa (unten). Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Aktin und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei die Expression der v.L. CASP-8 für K (unbehandelte Kontrolle) und der cl. CASP-8 für den fünf Minuten-Wert = 1 gesetzt wurde. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

So konnte parallel zu den vorangegangenen Tests (Abb. 25 bis 27) und in Ergänzung zu den Vorarbeiten (45) die CASP-8-Spaltung in der Western-Blotanalyse ebenfalls dargestellt werden.

Zusammenfassend betrachtet führte die durch SC-58635 induzierte selektive COX-2-Blockade in Hepatom-Zellen zu einer Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -9, sowie der Effektor-Caspase-3. Dies geschah sehr rasch innerhalb der ersten zwei Stunden SC-58635 Behandlung, also weit vor der messbaren Apoptose, welche erst nach zwölf Stunden erfasst wurde. Da die Aktivierung der CASP-8 mit den Todesrezeptorkomplexen assoziiert ist, weist ihre Beteiligung an der Apoptoseexekution auf die Einbeziehung des extrinsischen Apoptoseweges hin. *Downstream* der CASP-8 bieten sich für die Weiterleitung des Apoptosesignals zwei Alternativen an: Einmal wäre die von CASP-8 direkt ausgeübte Aktivierung der CASP-3 denkbar. Als weitere Möglichkeit kommt der intrinsische Signalweg über die Mitochondrien, mittels Translokation von tBID, in Betracht, auf den auch die Aktivierung der CASP-9 hinweist.

Aufgrund der frühen Einleitung der Apoptoseexekution wurde für die weitere Untersuchung der apoptotischen Signalwege immer auch der Zeitraum von zwei Stunden Behandlungsdauer

erfasst. Eine Ausnahme hiervon wurde bei den Apoptose-Analysen gemacht, da diese eine über mindestens zwölf Stunden dauernde Behandlung erforderten.

3.4. Charakterisierung des mitochondrien-vermittelten, intrinsischen Signalweges nach spezifischer COX-2-Inhibition durch SC-58635 in Hepatom-Zellen

3.4.1. Einfluss der SC-58635-Behandlung auf das mitochondriale Membranpotential

Werden im Verlauf der Apoptose die Mitochondrien aktiviert, drückt sich dies durch die Depolarisation des Membranpotentials (Ψ) der Mitochondrien-Membran aus (103). Dadurch werden die Membranen permeabel für eine Reihe apoptotischer Proteine, wie beispielsweise CYT-C oder DIABLO (*direct IAP binding protein with low pI*) (101). CYT-C aktiviert zusammen mit APAF-1 am Apoptosom ProCASP-9, deren Beteiligung nach selektiver COX-2-Blockade gezeigt wurde (Kap. 3.3) (93-95).

In HepG2- und HuH-7-Zellen wurde eine mögliche Potentialänderung nach SC-58635 induzierter Apoptose mit Hilfe der JC-1- und DiOC₆(3)-Färbung in der FACS-Analyse erfasst (s. dazu Kap. 2.2.7.2. und 2.2.7.3.). Dafür wurde, im Hinblick auf die Ergebnisse zur Caspasenaktivierung (Abb. 25 und 26), den ersten zwei Stunden der SC-58635-Behandlung besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Innerhalb dieser Zeit erfolgte in beiden Zelllinien ein signifikanter Anstieg der für die Potentialänderung entsprechend positiv gefärbten Zellen (Abb. 29). Die rasche Depolarisierung der Mitochondrienmembran, welche anhand beider Färbetechniken gezeigt werden konnte, war sowohl in HepG2- als auch in HuH-7-Zellen bereits nach einer Stunde messbar.

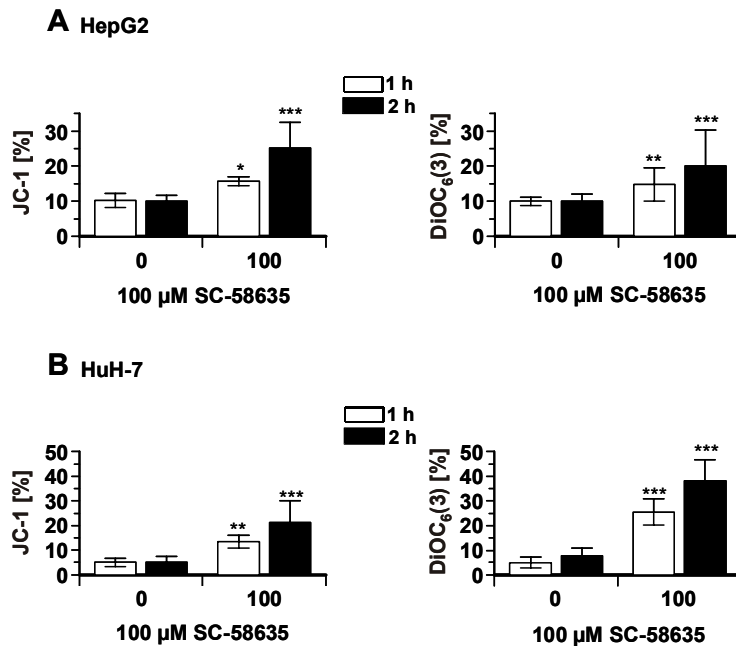


Abb. 29: Änderung des Membranpotentials während ein bis zwei Stunden SC-58635-Behandlung (100 µM) von HepG2- und HuH-7-Zellen. Pro Zelllinie wurde die JC-1- und DiOC₆(3)-Färbung durchgeführt. Entsprechend der jeweiligen Färbung bei depolarisiertem Membranpotential wurde die relative Zellzahl in % über der SC-58635-Konzentration aufgetragen (JC-1 [%] bzw. DiOC₆(3) [%]). In allen Abbildungen wurden jeweils zwei Versuche mit je sechs Einzelproben berücksichtigt. Die statistische Auswertung des SC-58635-Effektes in Abhängigkeit von der Zeit erfolgte mit dem Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*. * für $P < 0,05$; ** für $P < 0,01$; *** für $P < 0,001$. **A:** HepG2. Die jeweils unbehandelte Kontrolle K wurde zum Vergleich der beiden Färbungen gleich 10 % gesetzt. **B:** HuH-7. Die unbehandelte Kontrolle wurde jeweils gleich 5 % gesetzt.

Ergänzend hierzu konnte in einem weiteren Experiment eine dosisabhängige Änderung des Membranpotentials ab 50 µM SC-58635 innerhalb einer Stunde beobachtet werden (Abb. 30).

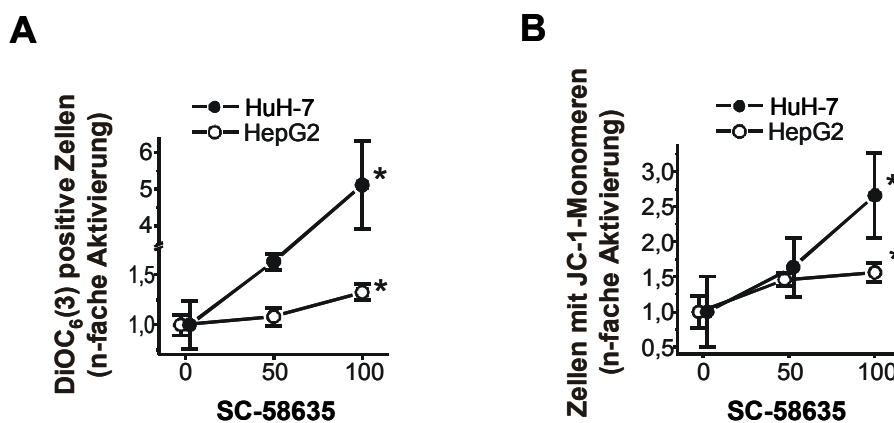


Abb. 30: Dosisabhängige Änderung des Membranpotentials während einer Stunde SC-58635-Behandlung (50 und 100 µM) von HepG2- und HuH-7-Zellen. In der Auswertung wurden für jede Zelllinie und Färbung jeweils zwei unabhängige Experimente mit jeweils sechs Einzelproben berücksichtigt. Die Ergebnisse wurden für einen besseren Vergleich als Aktivierung angegeben, wobei die Kontrollwerte jeweils gleich 1 gesetzt wurden. Die statistische Analyse wurde mit ANOVA durchgeführt; * für $P < 0,001$. **A:** Für die Depolarisierung der Membran positiv gefärbte Zellen mit DiOC₆(3)-Färbung. **B:** Zellen mit JC-1-Monomeren als Indikator für die Depolarisierung der Mitochondrienmembran.

Somit wurde die Mitochondrienmembran, sehr rasch und zeitnah zur Aktivierung der Caspasenkaskade, innerhalb von zwei Stunden selektiver COX-2-Blockade, depolarisiert. Zudem konnte in beiden Färbungen die Änderung des Membranpotentials während der SC-58635 induzierten Apoptose gezeigt werden.

Die Depolarisierung der Mitochondrienmembran steht in engem Zusammenhang mit der Porenbildung durch die Membranen (103, 104). BAX, ein pro-apoptotisches Protein der BCL-2-Familie, ist nun in der Lage, Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden (137, 138). Seine Rolle bei der Apoptoseexekution durch die selektive COX-2-Blockade wird in Kap. 3.4.4.2. weiter behandelt. Der auf die Depolarisation folgende CYT-C-Ausstrom wird in Kap. 3.4.3. charakterisiert.

Ob die SC-58635 induzierte Apoptoseexekution an den Mitochondrien in unmittelbarem Zusammenhang zur COX-2-Blockade steht, sollte der folgende Versuch beispielhaft veranschaulichen. HuH-7-Zellen wurden mit SC-58635 behandelt und gleichzeitig PGE₂, das Endprodukt des Prostaglandinstoffwechsels (17), zugegeben. Wenn die COX-2-Inhibierung eine direkte Rolle in der SC-58635 induzierten Apoptosevermittlung hat, sollte die Zugabe des Endproduktes des COX-2 katalysierten Prostaglandinstoffwechsels, PGE₂, die Apoptosewirkung aufheben.

Die FACS-Analyse der mit JC-1 gefärbten HuH-7-Zellen zeigte diesen Zusammenhang deutlich. Die positiv gefärbten Zellen nahmen mit SC-58635 und exogener PGE₂-Behandlung im Vergleich zu SC-58635 behandelten Zellen signifikant ab (Abb. 31). SC-58635 induzierte Apoptose in Hepatomzellen ist demnach auch auf einen direkten COX-2 inhibierenden Effekt zurückzuführen.

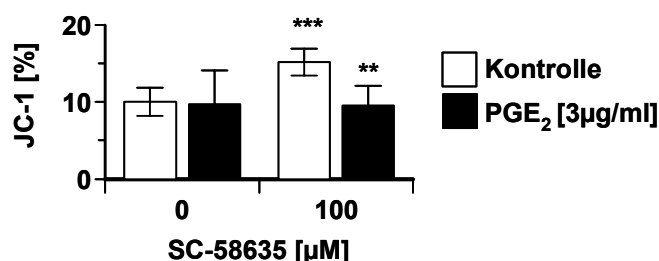


Abb. 31: PGE₂ verhindert die SC-58635 abhängige Depolarisierung der Mitochondrienmembran in HuH-7-Zellen. Die Zellen wurden eine Stunde gleichzeitig mit 100 µM SC-58635 und 3 µg/ml PGE₂ (45) behandelt. Die Änderung des Membranpotentials wurde durch JC-1-Färbung in der FACS-Analyse gemessen. Die Daten stellen die Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen mit je n = 6 dar. Der Vergleich der Kontrollbehandlung ohne und mit SC-58635 ergab $P < 0,001$ (***) , der Unterschied der SC-58635-Behandlung alleine und in Kombination mit PGE₂ ergab $P < 0,01$ (**) (Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*).

3.4.2. Einfluss von CASP-8 und CASP-3 auf die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials

Da CASP-8 und CASP-3 aktiv an der Apoptoseexekution beteiligt waren (Kap. 3.3.), wurde nachfolgend ihr Einfluss auf die Aktivierung der Mitochondrien analysiert. Denn die *upstream* der Mitochondrien gelegene CASP-8, so die Vorstellung, würde über die Spaltung von BID letztendlich die Mitochondrien aktivieren (144). CASP-3 könnte über die proteolytische Spaltung von MCL-1, wodurch dieses Protein proapoptotische Eigenschaften übernimmt, ebenfalls die Permeabilisierung der Mitochondrien beeinflussen (129). Würde dies zutreffen, sollte demnach die Inhibition der CASP-8 bzw. CASP-3 eine Reduktion der Mitochondrienaktivierung bewirken. Würde CASP-3 aber ausschließlich *downstream* der Mitochondrien agieren, dürfte das Membranpotential durch die Blockade der CASP-3 nicht beeinflusst werden.

Analog zur Untersuchung der Caspasenaktivierung und der Änderung des Membranpotentials wurden die Hepatomzellen zwei Stunden mit SC-58635 mit und ohne Caspaseinhibitoren behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für die FACS-Analyse mit DiOC₆(3) gefärbt. Die Untersuchung ergab einen signifikanten Rückgang der SC-58635 induzierten Potentialänderung durch Inhibition der CASP-8 und CASP-3 (Abb. 32A und B). Durch den Einsatz beider Caspaseinhibitoren blieben die Werte für die Potentialänderung ungefähr auf dem Wert der jeweiligen Kontrolle ohne SC-58635-Zugabe in HepG2- und HuH-7-Zellen.

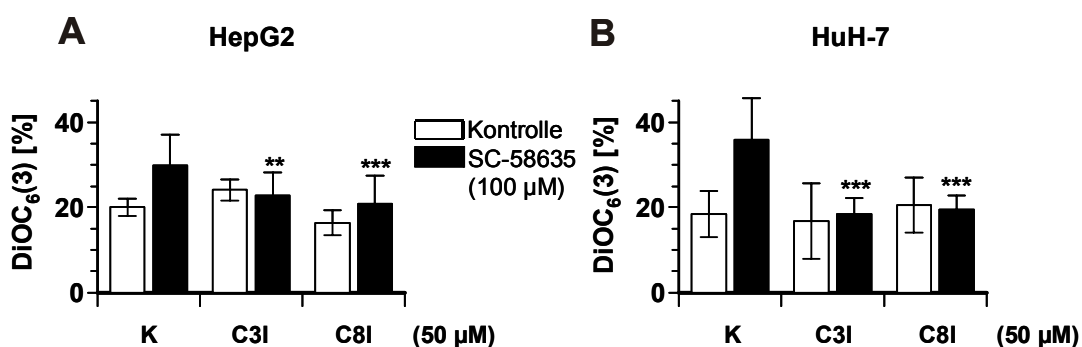


Abb. 32: Funktioneller Nachweis der Caspasenbeteiligung an der SC-58635 vermittelten Änderung des mitochondrialen Membranpotentials. Die Zellen wurden zwölf Stunden mit jeweils 50 µM des entsprechenden Caspaseinhibitors (CI) zwölf Stunden vorbehandelt. 100 µM SC-58635 wurde im Anschluss für zwei Stunden zugegeben. Die Änderung des Membranpotentials wurde mit der DiOC₆(3)-Färbung dargestellt. Zellen mit schwächerer Färbung wurden als DiOC₆(3) [%] über den entsprechenden Behandlungen aufgetragen. Die Ergebnisse wurden für jede Zelllinie aus jeweils drei unabhängigen Versuchen mit je n = 6 gemittelt. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*. Die Angaben über den Kombinationsbehandlungen bezeichnen die statistische Signifikanz im Vergleich zur Behandlung mit 100 µM SC-58635 alleine. **A:** HepG2. **, $P < 0,01$ und C8I ***, $P < 0,001$. **B:** HuH-7. ***, $P < 0,001$.

Damit war die Mitochondrienaktivierung nach selektiver COX-2-Inhibition in Hepatomzellen von CASP-8 und der *downstream* der Mitochondrien gelegenen CASP-3 beeinflusst.

3.4.3. SC-58635 induzierte CYT-C-Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma

Die Depolarisation der Mitochondrienmembran bewirkt die Öffnung der Membranen, wodurch CYT-C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt wird (103). Im Zytoplasma schließlich bildet CYT-C mit APAF-1 und Pro-CASP-9 das Apoptosom, welches im Zusammenspiel mit ATP/dATP CASP-9 aktiviert (93-95). Sowohl die Aktivierung und Beteiligung der CASP-9 (Abb. 25 bis 27) als auch die Depolarisation der Mitochondrienmembran (Abb. 29 und 30) konnten in der vorliegenden Arbeit belegt werden. Dementsprechend sollte durch SC-58635-Behandlung der CYT-C-Gehalt im Zytoplasma der Hepatomzellen zunehmen, während sich der Gesamtgehalt des Proteins nicht ändert.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde eine Western-Blotanalyse des Gesamtproteins und des zytoplasmatischen Proteins für CYT-C durchgeführt. Dafür wurden die Zellen jeweils fünf und 30 Minuten sowie eine Stunde mit SC-58635 behandelt.

Ein Blick auf die Gesamtproteinfraktion zeigte den CYT-C-Status während einer Stunde selektiver COX-2-Blockade unverändert (Abb. 33A). In der zytoplasmatischen Fraktion dagegen wurde die Akkumulation von CYT-C bereits eine Stunde nach Apoptoseinduktion mit SC-58635 sichtbar (Abb. 33B). Dabei war der CYT-C-Gehalt viermal höher als in der unbehandelten Kontrolle. Damit konnte die Zunahme von CYT-C im Zytoplasma zeitnah zur Aktivierung der Mitochondrien veranschaulicht werden.

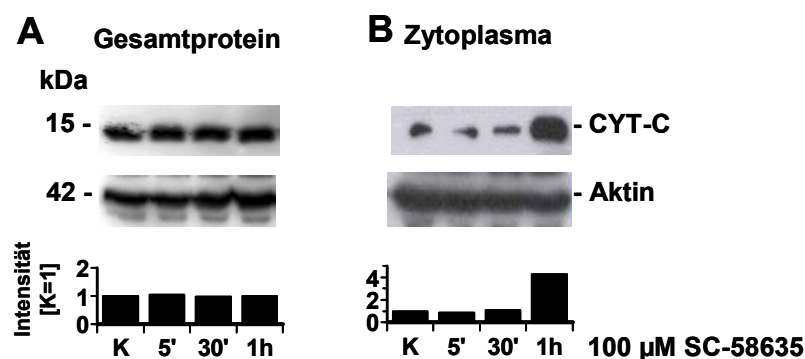


Abb. 33: CYT-C-Freisetzung ins Zytoplasma nach einer Stunde selektiver COX-2-Blockade (100 µM SC-58635) von HuH-7-Zellen. Western-Blotanalyse der Gesamtproteinfraktion und der zytoplasmatischen Proteinfraktion. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Aktin und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei der CYT-C-Gehalt von K (unbehandelte Kontrolle) = 1 gesetzt wurde. **A:** Gesamtprotein. **B:** zytoplasmatische Proteinfraktion.

3.4.4. Analyse pro- und antiapoptotischer Proteine der BCL-2-Familie nach selektiver COX-2-Blockade

Zur BCL-2-Familie gehören sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine, welche im Zusammenspiel einen wichtigen Einfluss auf das Geschehen an den Mitochondrien ausüben (109). Die bisherigen Ergebnisse wiesen auf die Beteiligung von Vertretern dieser Proteinfamilie hin. Die Vermeidung der Depolarisierung der Mitochondrienmembranen mit C8I implizierte eine Vermittlerrolle von BID zwischen CASP-8 und den Mitochondrien. Die Depolarisierung der Mitochondrienmembranen mit der verbundenen CYT-C-Freisetzung deutete auf die Beteiligung von BAX als Porenöffner der mitochondrialen Membran bei der Apoptoseexekution. Schließlich wies die Spaltung der CASP-3 verbunden mit ihrem Einfluss auf die *upstream* gelegenen Mitochondrien auf eine Beteiligung von MCL-1 als möglichem Substrat der Caspase hin.

3.4.4.1. Rolle des antiapoptotischen MCL-1 bei der SC-58635 induzierten Apoptose

Bei Apoptoseinduktion wird das antiapoptotische MCL-1 aufgrund der Aktivität proapoptotischer Proteine, wie BOPs vom Typ I und II, aus seiner Bindung mit BAK herausgelöst (122, 123). Dadurch kann MCL-1 proteasomal abgebaut werden (107, 110) und die Abnahme von MCL-1 im Laufe der Apoptoseexekution wäre die Folge. Zudem fördert der hohe *turn-over* von MCL-1 selbst, die Abnahme des Proteins (113). Würde MCL-1 durch CASP-3 gespalten werden, hätte dies ebenfalls die Abnahme der vollen Länge zur Folge. Da MCL-1 in den Mitochondrien lokalisiert ist, wurde sein Proteingehalt zunächst mit Hilfe der Western-Blotanalyse der mitochondrialen Proteinfraction nach Apoptoseinduktion mit SC-58635 dargestellt. Die Probenahme erfolgte nach fünf und 30 Minuten, sowie nach einer, zwei, vier, sechs, zwölf und 24 Stunden.

Die Kinetik veranschaulichte die Abnahme von MCL-1 in den Mitochondrien der Hepatomzellen während 24 Stunden SC-58635-Behandlung (Abb. 34). Parallel zur CASP-3-Aktivität, welche innerhalb von zwei Stunden bereits bis zu fünf mal höher als in unbehandelten Zellen war (Abb. 25 u. 26), nahm MCL-1 innerhalb dieses Zeitraumes auf weniger als 50 % der Ausgangskonzentration ab. In den folgenden 22 Stunden blieb der MCL-1-Gehalt in HepG2-Zellen in etwa auf gleichem Niveau erhalten (Abb. 34A). Dagegen nahm MCL-1 in HuH-7-Zellen zwar leicht zu, das Ausgangsniveau wurde aber nicht überschritten (Abb. 34B).

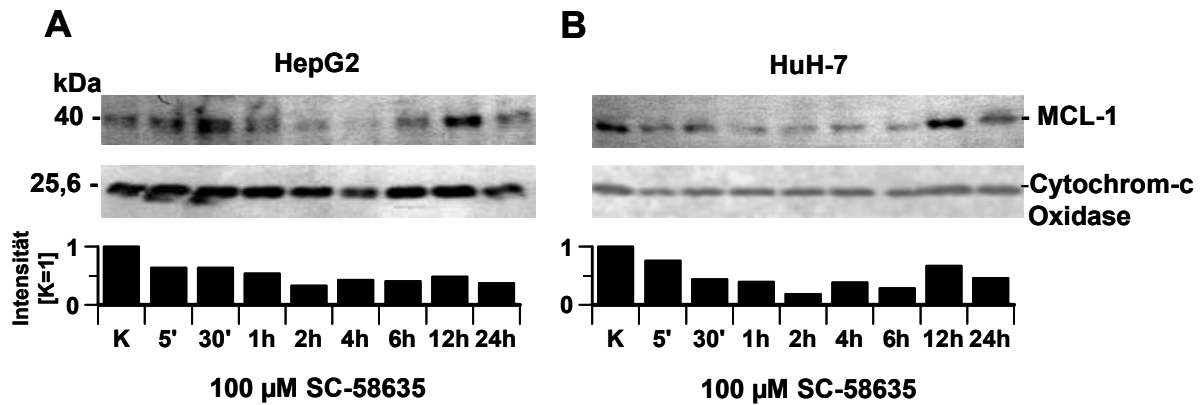


Abb. 34: Abbau von MCL-1 in den Mitochondrien während 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 µM). Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle für die mitochondriale Fraktion mit Cytochrom-c-Oxidase. Dabei wurde die MCL-1-Expression von K (unbehandelte Kontrolle) als Intensität der Bandenstärke mit K = 1 angegeben. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

Dagegen stellte sich MCL-1, aufgrund seiner Zunahme in den ersten 30 Minuten, im Gesamtprotein in beiden Zelllinien, anders dar. Während der nächsten 30 Minuten wurde der Gehalt um ca. 50 % des Anfangswertes reduziert, mit abnehmender Tendenz über die folgenden 23 Stunden (Abb. 35). Somit konnte eine kurzzeitige Gegenregulierung von MCL-1 nach Apoptoseinduktion mit SC-58635 auf Proteinebene im Gesamtzelllysat gezeigt werden. Gleichzeitig wurde MCL-1 in den Mitochondrien, dem eigentlichen Wirkungsort, von Beginn der SC-58635-Behandlung an abgebaut. Dennoch konnte auch hier eine leichte Gegenregulation zu späteren Zeitpunkten, zwischen vier und zwölf Stunden, beobachtet werden.

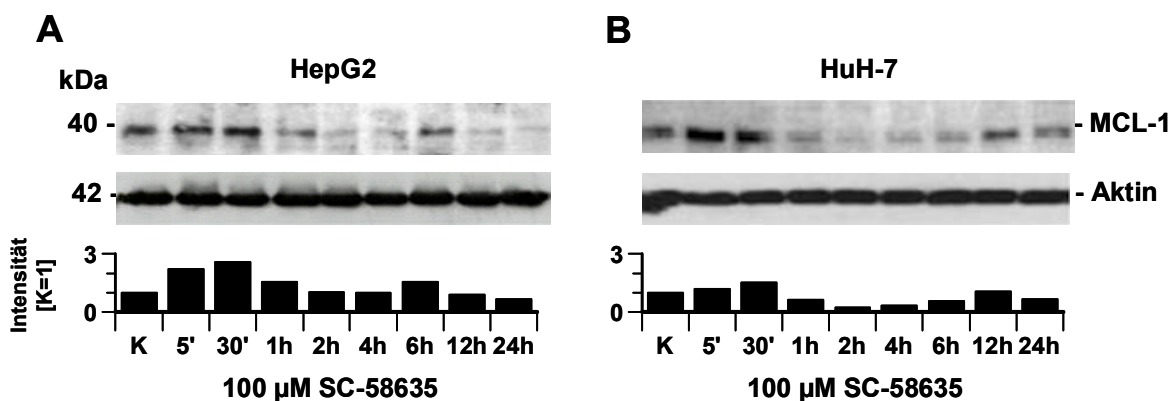


Abb. 35: Gesamtproteingehalt von MCL-1 während 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 µM). Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Aktin und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei die MCL-1-Expression von K (unbehandelte Kontrolle) = 1 gesetzt wurde. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

Der Abbau von MCL-1 könnte neben dem hohen *turn-over* auch auf eine mögliche Spaltung durch CASP-3 zurückgeführt werden (113, 228). In diesem Fall wirkt das Spaltprodukt von MCL-1 proapoptotisch (129) und eine MCL-1-Überexpression sollte die SC-58635 induzierte Apoptose verstärken. Andererseits würde demnach eine MCL-1-Inhibition während der selektiven COX-2-Blockade antiapoptotisch wirken.

Zuerst wurde der Einfluss von MCL-1 auf die Apoptoseexekution über die Inhibition der Proteinsynthese mittels siRNA für *mcl-1* dargestellt. Als Kontrolle für die siRNA selbst diente in den Experimenten eine siRNA, die gegen das, in humanen Zellen nicht vorhandene, *gfp*-Gen gerichtet war. Erwartungsgemäß war, wie die Western-Blotanalyse demonstrierte, deren Einfluss auf die MCL-1-Synthese zu vernachlässigen (Abb. 36). Während die MCL-1-Expression in HuH-7-Zellen zu ca. 75 % unterdrückt wurde (Abb. 36B), war MCL-1 in HepG2-Zellen nach Zugabe von siRNA gegen *mcl-1* in der Western-Blotanalyse nicht mehr nachweisbar (Abb. 36A). Die so transfizierten Zellen wurden 24 Stunden mit SC-58635 behandelt und im Anschluss die Apoptose mit der Nicoletti-Färbung in der FACS-Analyse ermittelt. Genetisch unmanipulierte Zellen wurden parallel als Kontrolle mitbehandelt.

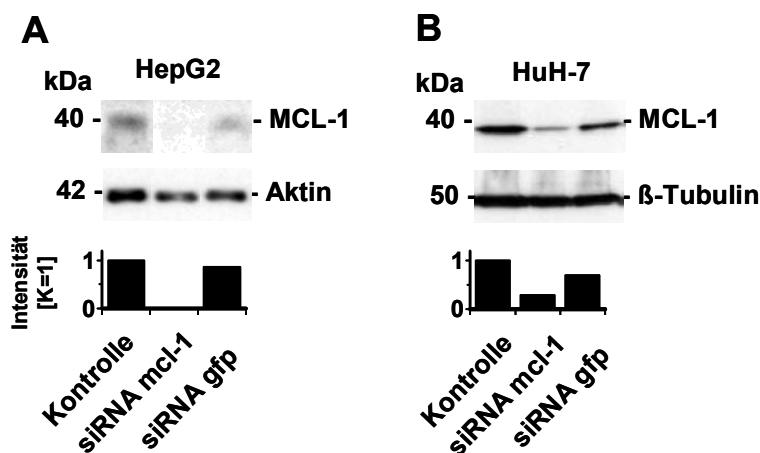


Abb. 36: MCL-1-Expression nach Transfektion von siRNA *gfp* und siRNA *mcl-1*. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Aktin (A) bzw. β -Tubulin (B) und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei die MCL-1-Expression von K (unbehandelte Kontrolle) = 1 gesetzt wurde. **A:** HepG2.. **B:** HuH-7.

Die Transfektion mit siRNA *gfp* hatte keine Auswirkungen auf die Apoptose, wie der Vergleich mit nicht transfizierten Zellen ergab (Abb. 37). Die verminderte MCL-1-Expression in HuH-7-Zellen führte im Vergleich zu den Zellen mit transfizierter siRNA *gfp* zu einer signifikanten Apoptosesteigerung von 22 % auf 29,5 % (Abb. 37B). In HepG2-Zellen bewirkte die fehlende MCL-1-Expression ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Apoptose von 23 % auf 37 % (Abb. 37A). Dadurch wurde zum einen eine MCL-1-Abhängigkeit in der

SC-58635 induzierten Apoptoseexekution demonstriert, andererseits bestätigte die Zunahme der Apoptose aufgrund der MCL-1-Inhibierung die antiapoptotischen Eigenschaften dieses Proteins.

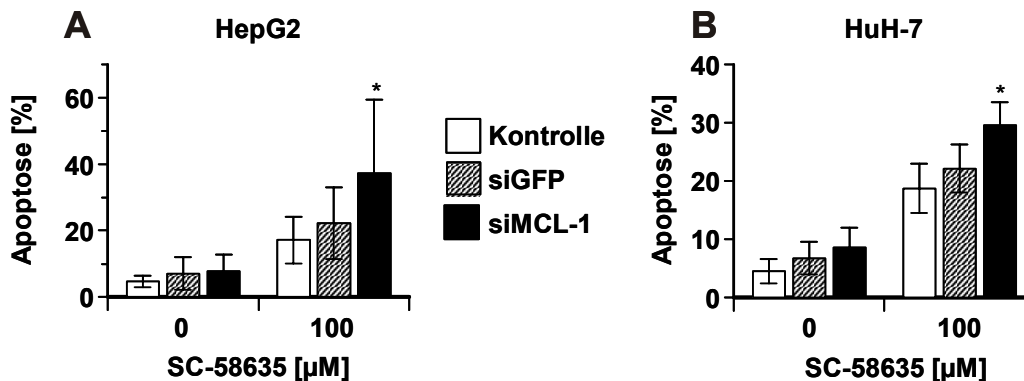


Abb. 37: Die Inhibierung von antiapoptotischem MCL-1 durch Transfektion mit siRNA mcl-1 führt während 24 Stunden SC-58635-Behandlung mit 100 μM zu einer signifikanten Apoptosesteigerung im Vergleich zur Kontrolle mit siRNA gfp. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden aus vier Versuchen mit je $n = 3$ gemittelt. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*. Die statistischen Angaben beziehen sich auf den Vergleich der Behandlungen mit 100 μM SC-58635 siRNA gfp und mit siRNA mcl-1 transfizierter Zellen, wobei $P < 0,05$ (*) **A:** HepG2.. **B:** HuH-7.

Ergänzend zur Blockade der MCL-1-Synthese wurde MCL-1 mittels Transfektion der entsprechenden cDNA überexprimiert, als Kontrolle diente der Leervektor pEF4. Exemplarisch wurde die MCL-1-Überexpression in der Western-Blotanalyse an HepG2-Zellen gezeigt (Abb. 38C). Die FACS-Analyse für die Apoptose bei Überexpression wurde analog zum vorhergehenden Versuch, jedoch über 48 Stunden durchgeführt.

Nach 48 Stunden selektiver COX-2-Blockade ergaben die Messungen eine signifikante Reduktion der Apoptose in beiden Hepatomzelllinien, wenn MCL-1 im Überschuss exprimiert wurde (Abb. 38A und B). In Ergänzung zu den Versuchen mit mcl-1-siRNA belegte dieses Ergebnis ebenfalls die Abhängigkeit der Apoptosevermittlung von MCL-1 und bestätigte seine antiapoptotische Funktion. Würde MCL-1 durch CASP-3 in ein proapoptisches Produkt gespalten, müsste eine Expressionsverstärkung von MCL-1 pro- und nicht antiapoptotisch wirken.

Zusammenfassend beeinflussten sowohl die Blockade als auch die Überexpression von MCL-1 die SC-58635 induzierte Apoptoseexekution nachhaltig. Damit wurde die Beteiligung von MCL-1 in der Apoptosevermittlung nach selektiver COX-2-Inhibition mittels SC-58635 in Hepatomzellen deutlich. Die antiapoptotische Funktion von MCL-1 blieb, den Ergebnissen

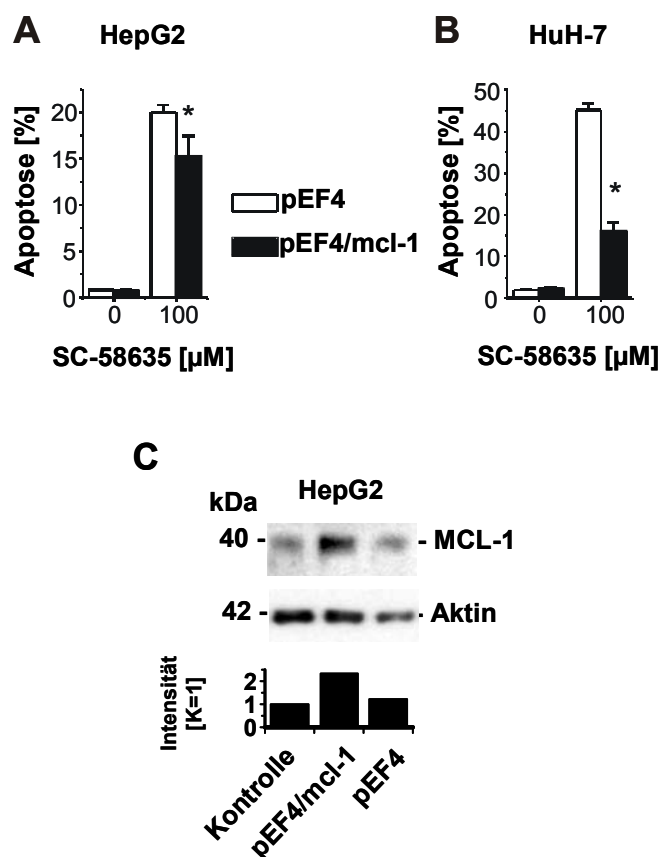


Abb. 38: Überexpression von Mcl-1 durch Transfektion von mcl-1-cDNA führt innerhalb 48 Stunden SC-58635-Behandlung mit 100 µM zu einer signifikanten Apoptosereduktion im Vergleich zur Kontrolle mit Leervektor. **A (HepG2)** und **B (HuH-7):** FACS-Analyse nach Nicoletti-Färbung. Pro Zelllinie wurden zwei Versuche mit je n = 3 ausgewertet. Die statistische Auswertung des MCL-1-Effektes erfolgte nach der multivariaten ANOVA, wobei $P < 0,05$ (*). **C:** Western-Blotanalyse der MCL-1-Expression nach Transfektion mit pEF4/mcl-1 und dem Kontrollvektor pEF4. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Aktin und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei die MCL-1-Expression von K (unbehandelte Kontrolle) = 1 gesetzt wurde.

gemäß, erhalten, womit MCL-1 als Substrat der CASP-3 – mit pro-apoptotischem Spaltprodukt (129) – ausgeschlossen werden musste. Demnach wurde der CASP-3-Einfluss auf die Mitochondrien, wie er in Kap. 3.4.2. demonstriert wurde, nicht über MCL-1 ausgeübt.

3.4.4.2. Translokation von BAX an die Mitochondrien

Während der Exekution der Apoptoseexekution kann BAX als stabiles Dimer an das Mitochondrium translozieren, wo es oligomerisiert wird und sich mit seiner Transmembrandomäne an den Porenproteinen der Mitochondrienmembran anlagert (135). Dadurch werden die Poren in der Membran geöffnet (108, 137, 138), die in Kap. 3.4.3. beschriebene Cytochrom-c-Freisetzung ist die Folge.

Die Western-Blotanalyse des Gesamtproteinlysats beider Hepatomzelllinien demonstrierte zunächst einen unveränderten BAX-Status während 24 Stunden selektiver COX-2-Blockade (Abb. 39).

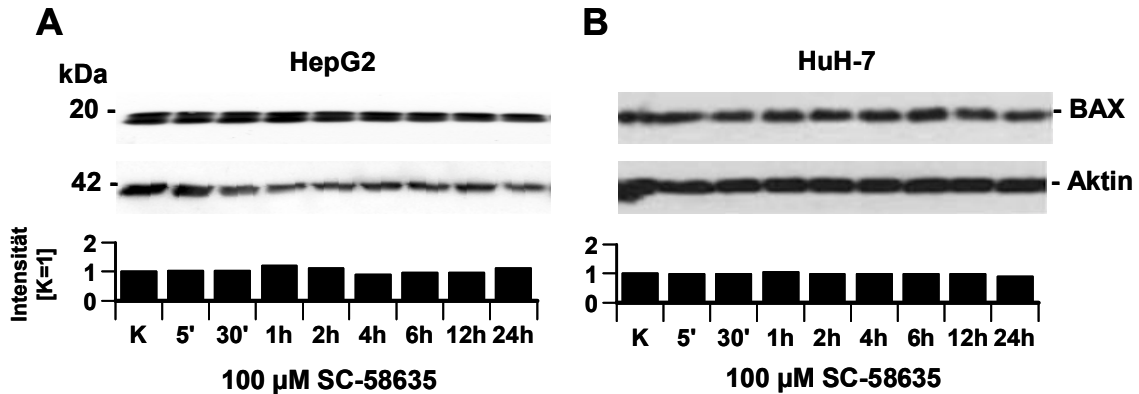


Abb. 39: Unveränderter BAX-Gesamtstatus während 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 µM). Western-Blotanalyse des Gesamtproteins. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Aktin und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei die BAX-Expression von K (unbehandelte Kontrolle) = 1 gesetzt wurde. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

Dagegen ergab die Analyse der mitochondrialen Proteinfraction eine achtfache Zunahme von BAX in HepG2-Zellen und war bis zu dreifach in HuH-7-Zellen über 24 Stunden. Bereits nach fünf Minuten in HepG2-Zellen (Abb. 40A) und nach einer Stunde in HuH-7-Zellen (Abb. 40B) war der BAX-Gehalt an den Mitochondrien veroppelt. Somit konnte mit Hilfe der Western-Blotanalyse eine rasche Translokation von BAX an die Mitochondrien in beiden Zelllinien gezeigt werden.

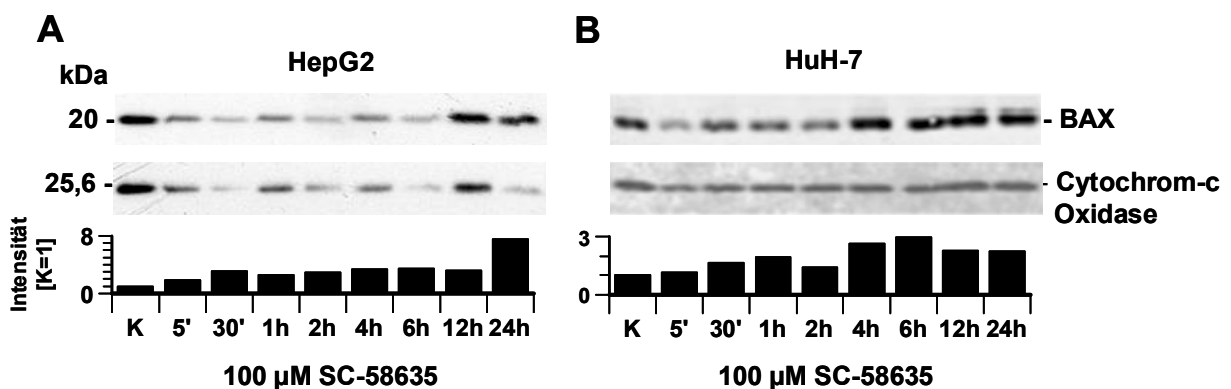


Abb. 40: Anreicherung von BAX an den Mitochondrien während 24 Stunden SC-58635-Behandlung (100 µM). Western-Blotanalyse der mitochondrialen Proteinfraction. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der Ladekontrolle mit Cytochrom-c-Oxidase für die mitochondriale Fraktion. Dabei wurde die BAX-Expression von K (unbehandelte Kontrolle) als Intensität der Bandenstärke mit K = 1 angegeben. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

3.4.4.3. Translokation von BID an die Mitochondrien

Die Aktivierung der CASP-8, Translokation von BAX an die Mitochondrien und Depolarisierung der Mitochondrienmembranen wiesen auf die Beteiligung von BID nach SC-58635 induzierter Apoptose hin. Die über die Todesrezeptoren aktivierte CASP-8 spaltet BID (22kDa) – auch als Vollängen-BID (v.L.BID) bezeichnet –, welches als tBID (15 kDa) zum Mitochondrium transloziert, wo es BAX oligomerisiert (88, 136, 145, 150).

Somit wurde die Detektion von tBID in der Western-Blotanalyse der mitochondrialen Proteinfraction erwartet. In den hier untersuchten Hepatomzellen stellte sich die Rolle von BID jedoch anders dar. Während 24 Stunden SC-58635-Behandlung, welche in engmaschige Zeitabstände unterteilt waren, konnte tBID, bei 15 kDa, in den beiden untersuchten Proteinfractionen weder in HepG2- noch in HuH-7-Zellen detektiert werden (Abb. 41 und 42 jeweils A und B).

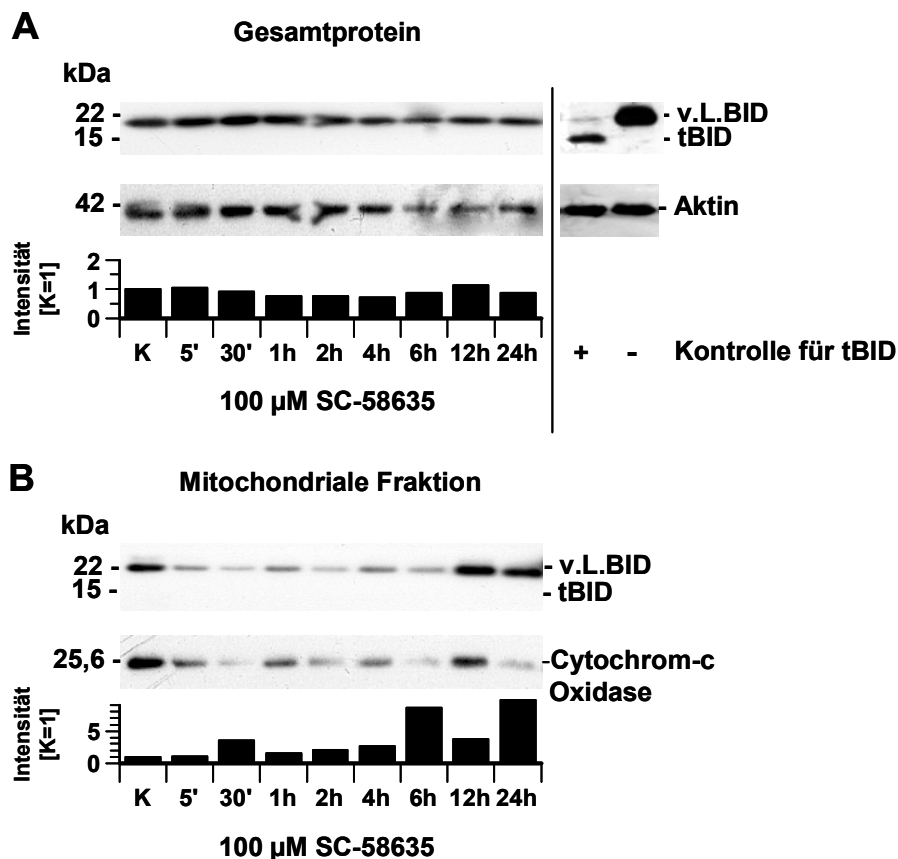


Abb. 41: Western-Blotanalyse von v.L.BID (22 kDa) und tBID (15 kDa) innerhalb 24 Stunden SC-58635 Behandlung von HepG2-Zellen. Die densitometrische Auswertung erfolgte nach der jeweiligen Ladekontrolle und wurde als Intensität der Bandenstärke angegeben, wobei die BID-Expression von K (unbehandelte Kontrolle) = 1 gesetzt wurde. **A:** Analyse des Gesamtproteins mit der Positivkontrolle für tBID und Ladekontrolle für Aktin. **B:** Darstellung der mitochondrialen Proteinfraction mit der Ladekontrolle Cytochrom-c Oxidase.

Die Analyse der jeweiligen mitochondrialen Proteinfractionen ergab eine erhöhte v.L.BID-Konzentration nach 30 Minuten in HepG2-Zellen und innerhalb von zwei Stunden in HuH-7-Zellen (Abb. 41B und 42B). Dagegen blieb v.L.BID (22 kDa) im Gesamtprotein unreguliert (Abb. 41A und 42A). Die Ergebnisse weisen somit auf eine Verlagerung von v.L.BID an die Mitochondrien, womit eine direkte Aktivierung von BID durch die proteolytische Spaltung mittels CASP-8 ausgeschlossen werden konnte (s. Kap. 3.3.).

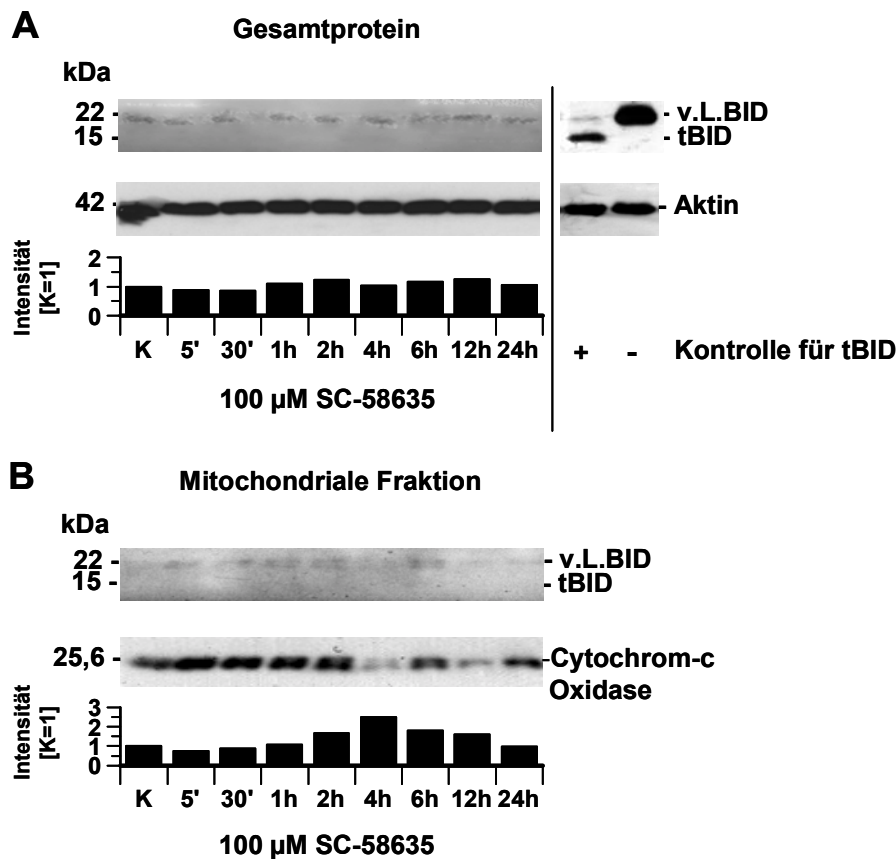


Abb. 42: Western-Blotanalyse von v.L.Bid (22 kDa) und tBID (15 kDa) in HuH-7-Zellen innerhalb 24 Stunden SC-58635-Behandlung. Die densitometrische Auswertung erfolgte wie zu Abb. 41 beschrieben. **A:** Analyse des Gesamtproteins mit der Ladekontrolle für Aktin. Rechts: Positivkontrolle für tBID. **B:** Mitochondriale Proteinfraction mit der Ladekontrolle Cytochrom-c Oxidase.

Insgesamt zeigten die untersuchten BCL-2-Familienmitglieder eine rasche Dynamik bereits ab fünf Minuten bis zwei Stunden nach selektiver COX-2-Blockade mittels SC-58635. Dies wiederum erfolgte parallel zur frühen Aktivierung der CASP-3, CASP-8 und CASP-9, der raschen Depolarisation der Mitochondrienmembran und der daraus folgenden Cytochrom-c-Freisetzung ins Zytoplasma.

3.5. Charakterisierung des extrinsischen Signalweges nach SC-58635 induzierter Apoptose

In Kapitel 3.3. konnte die Aktivierung und damit Spaltung der CASP-8 nach selektiver COX-2-Blockade belegt werden. Da diese Aktivierung autoproteolytisch über die Protein-Protein-Interaktion von FADD mit dem Vorläuferprotein der CASP-8, der ProCASP-8, geschieht (92), war die Beteiligung des extrinsischen Signalweges denkbar. Denn FADD steht als Adapterprotein des DISC-Komplexes und des "TRADDosoms" zentral im extrinsischen, über die Todesrezeptoren vermittelten Signalweg (156).

3.5.1. Beteiligung von FADD während der SC-58635 induzierten Apoptose

Aufgrund seiner zentralen Stellung in den Todesrezeptorsystemen (156) gibt eine funktionelle Analyse von FADD Aufschluss über eine grundsätzliche Beteiligung des extrinsischen Signalweges an der Apoptoseexekution. Werden Todesrezeptoren durch selektive COX-2-Inhibition angesprochen, sollte demnach eine Blockade von FADD die Apoptosesensitivität der Zellen deutlich reduzieren. Hierfür wurde ein *fadd* Δ^- -Gen (s. Kap. 2.1.4.) mittels adenoviralem Gentransfer, mit einer Virenlast von 3 moi, in die Hepatomzellen eingebracht. Das daraus resultierende Genprodukt ist ein FADD-Protein ohne DED, wodurch es nicht mehr mit CASP-8 in Protein-Interaktion treten kann. Zur Kontrolle des Infektionseffekts wurde ein Parallelansatz mit einem adenoviralen Kontrollvektor, welcher das für die Hepatomzellen funktionsfreie lac-z-Gen für β -Gal enthielt, durchgeführt. Dem wurde gleichzeitig die SC-58635-Wirkung an genetisch unmanipulierten Zellen gegenübergestellt. Zur besseren Darstellung der Apoptosereduktion wurde die SC-58635-Behandlung auf 48 Stunden ausgedehnt. Die Apoptose aller drei Ansätze wurde in der FACS-Analyse nach Nicoletti-Färbung gemessen.

Der Vergleich der Apoptose genetisch unmanipulierter Zellen und mit Ad β -Gal infizierten Zellen zeigte keinen Einfluss auf das Apoptosegeschehen durch die Infektion selbst (Abb. 43A und B). Dagegen nahm in beiden Zelllinien die Apoptose der FADD blockierten Zellen im Vergleich zu den mit Kontrollvektor infizierten Zellen um 33 % (HepG2) und 45 % (HuH-7) signifikant ab (Abb. 43A und B).

Die Versuche zur Blockade von FADD konnten somit die funktionelle Beteiligung dieses wichtigen Adaptorproteines in den Todesrezeptorsystemen während der Apoptoseexekution nach selektiver COX-2-Blockade zeigen.

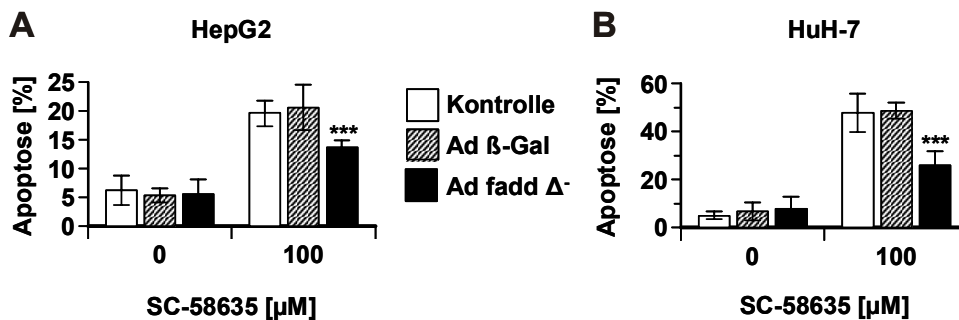


Abb. 43: Inhibition von FADD durch adenoviralen Gentransfer mit fadd Δ^- verringert die Apoptose nach 48 Stunden SC-58635-Behandlung signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Ad β -Gal. Die Zellen wurden mit jeweils 3 moi Adenoviren, welche entweder fadd Δ^- oder den Kontrollvektor mit β -Gal enthielten, transfiziert. Zur Kontrolle wurde ein Parallelansatz an unmanipulierten Zellen durchgeführt. Die Behandlungszeit mit 100 μ M SC-58635 betrug 48 Stunden. Die Ergebnisse wurden für jede Zelllinie aus jeweils drei unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ gemittelt. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*. Der P-Wert bezieht sich auf den Vergleich der SC-58635 behandelten Zellen mit Ad fadd Δ^- im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Ad β -gal. *** $P < 0,001$. **A:** HepG2.. **B:** HuH-7.

3.5.1.1. Einfluss von FADD auf die Mitochondrien

Da CASP-8 schon einen erheblichen Einfluss auf die Apoptoseexekution über die Mitochondrien ausübte (Abb. 32), wurde analog dazu die Auswirkung der FADD-Inhibition auf das mitochondriale Membranpotential bestimmt. Dafür wurden HepG2- und HuH-7-Zellen analog zur vorangegangenen Untersuchung der Apoptosesensitivität mit Ad fadd Δ^- und Ad β -Gal infiziert. Zur besseren Darstellung einer möglichen Blockade der Membrandepolarisierung wurden die Zellen statt zwei Stunden 24 Stunden lang mit SC-58635 behandelt. Die Änderung des Membranpotentials wurde mit der DiOC₆(3)-Färbung in der FACS-Analyse dargestellt.

Wie Abb. 44 zeigt, wurde das Mitochondrienpotential beider Zelllinien durch die Inhibition von FADD beeinflusst. Dabei wurde die Depolarisierung des Membranpotentials in HepG2-Zellen zu einem Sechstel, in HuH-7-Zellen um mehr als die Hälfte reduziert. Somit wurde eine Verbindung des nach selektiver COX-2-Blockade induzierten Apoptosesignalwegs von den Todesrezeptorsystemen zu den Mitochondrien gezeigt. Gleichzeitig wurde damit auch der CASP-8-Einfluss auf die Mitochondrien, wie er in Kapitel 3.4.2. beschrieben wurde, indirekt bestätigt.

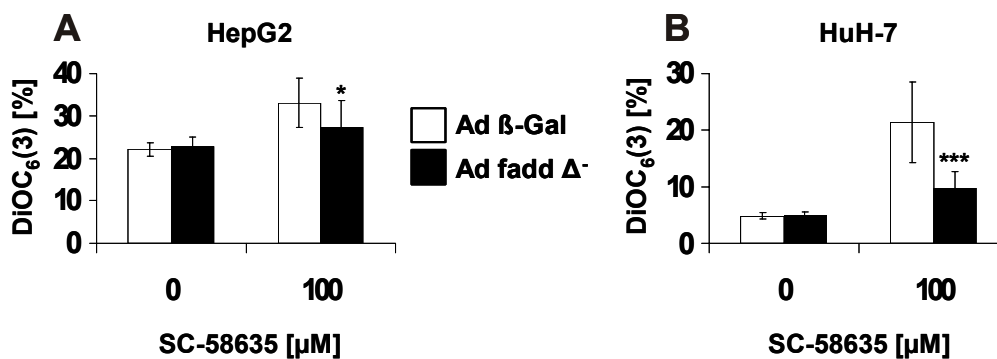


Abb. 44: FADD Δ^- reduziert die Aktivierung der Mitochondrien. Die Zellen wurden mit jeweils 3 moi Adenoviren, welche entweder fadd Δ^- oder den Kontrollvektor mit β -Gal enthielten, transfiziert und im Anschluss 24 Stunden mit SC-58635 behandelt. Die Darstellung der Änderung des Membranpotentials erfolgte mittels DiOC₆(3)-Färbung. Zellen mit schwächerer Färbung wurden als DiOC₆(3) [%] über der Konzentration von SC-58635- aufgetragen. Die Ergebnisse wurden für jede Zelllinie aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen mit je n = 6 gemittelt. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*. Der P-Wert bezieht sich auf den Vergleich der SC-58635 behandelten Zellen mit Ad fadd Δ^- im Vergleich zu den Zellen mit Ad β -Gal. **A:** HepG2. $P < 0,05$ (*). **B:** HuH-7. $P < 0,001$ (***).

3.5.2. Kinetik der Todesrezeptoren an der Zellmembran

Die Beteiligung von FADD bei der Apoptoseexekution durch SC-58635 ließ generell auf die Beteiligung des extrinsischen Weges über die Todesrezeptoren schließen. Werden die Todesrezeptoren durch Apoptosesignale angesprochen, translozieren sie aus dem Golgi-System, in welchem sie als Vorrat internalisiert vorliegen, an die Membranoberfläche (151-155). Dort werden die Rezeptoren oligo- bzw. trimerisiert, woraufhin sich nun ihre entsprechenden Liganden, anti-Apo-1 (Ligand für CD95), TRAIL und TNF α , anlagern können (163, 164, 168). Ein weiteres Regulativ ist die transkriptionelle Expression der Todesrezeptoren, welche aber zusätzliche Reaktionszeit in Anspruch nimmt. In den folgenden Versuchen wurde die Rekrutierung der Todesrezeptoren CD95, TRAIL-R1 und -R2, sowie TNF an die Zellmembran in der FACS-Analyse erfasst. Hierfür wurden die membranständigen Rezeptoren CD95, TNF-R1 und TRAIL-R1 und -R2 mit ihren jeweils spezifischen Erstantikörpern inkubiert und anschließend über Zweit- und fluoreszierende Drittantikörper gefärbt. Die SC-58635-Behandlung erfolgte über 24 Stunden mit der Standardkonzentration 100 μ M zur Untersuchung der raschen Apoptosevermittlung, wie sie bisher in der Arbeit gezeigt wurde.

In den unbehandelten Zellen beider Zelllinien war TRAIL R2 zu 50 % (HepG2) bis 60 % (HuH-7) an der Membran vertreten (Abb. 45 u. 46 jeweils A u. B). Auffallend war die hohe Präsenz (über 70 %) von TNF-R1 in HuH-7-Zellen (Abb. 45B und 46B) während seine membranäre Expression in HepG2-Zellen unter 20 % lag. Dagegen war CD95 in

HepG2-Zellen drei mal mehr präsent als in HuH-7-Zellen.

In beiden Zelllinien war die Kinetik der membranären Expression der Rezeptoren unter der Einwirkung von 100 μM SC-58635 signifikant (Abb. 45). Eine Ausnahme hiervon bildete der CD95-Rezeptor in HuH-7-Zellen, der über den gesamten Zeitraum unverändert und wenig präsent an der Zelloberfläche war (Abb. 45B). Dagegen nahm CD95 innerhalb der ersten zwei Stunden an der Membranaußenseite der HepG2-Zellen zu (Abb. 45A). Nach 24 Stunden hatte die CD95-Expression wieder die Ausgangskonzentration an der Zelloberfläche erreicht. TRAIL-R2 nahm in der ersten Stunde SC-58635-Behandlung ab und stabilisierte sich im Anschluss wieder auf dem Niveau der Rezeptorkonzentration der unbehandelten Zellen. TNF-R1 und TRAIL-R1 wurden im Gegensatz dazu, beginnend mit der selektiven COX-2-Inhibition, kontinuierlich internalisiert (Abb. 45A). In HuH-7-Zellen wurde TRAIL-R2 schon in der ersten Stunde hochreguliert und danach internalisiert, wogegen die TNF-R1 Expression von Anfang an kontinuierlich von 72 % auf 2,5 % abnahm. TRAIL-R1 wurde dagegen nur moderat internalisiert (Abb. 45B). Die starke Präsenz über 24 Stunden

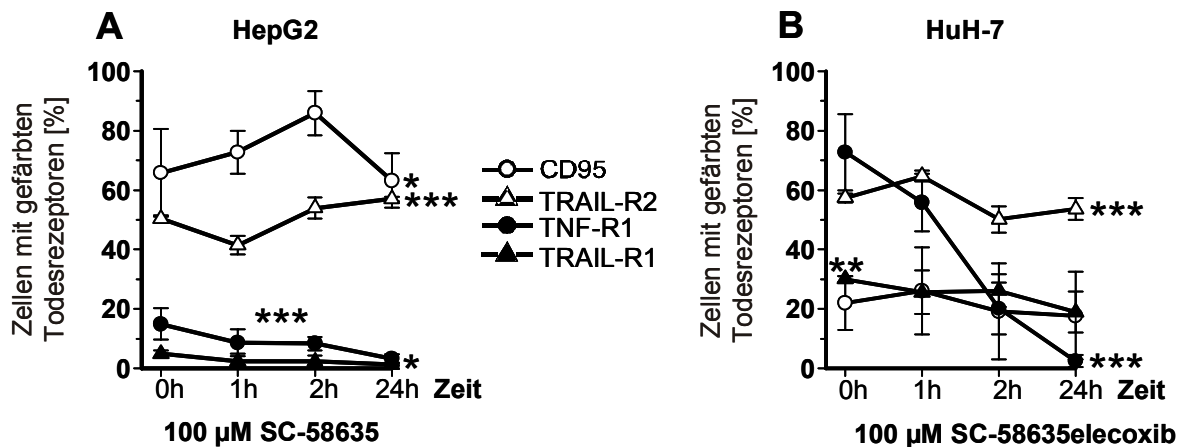


Abb. 45: Kinetik der Todesrezeptoren an der Zellmembran über 24 Stunden SC-58635 Behandlung mit 100 μM . FACS-Analyse der gefärbten Todesrezeptoren CD95, TNF, TRAIL-R1 und -R2 an der Zelloberfläche. Dargestellt sind die positiv gefärbten Zellen über der Zeit. Die statistische Auswertung des Zeiteffektes (Kurvenverlauf) erfolgte mittels ANOVA. $P < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**); $P < 0,001$ (***). Gemittelt wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils $n = 3$. **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

von TRAIL-R2 und CD95 an der Zelloberfläche von HepG2-Zellen gab damit auch einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von p53. Das Tumorsuppressorprotein ist ein Transkriptionsfaktor dieser beiden Todesrezeptoren. Außerdem war die Regulierung der CD95-Rezeptorexpression an der Zelloberfläche nur mit WT p53 und nicht mit mutiertem p53, wie in HuH-7-Zellen, möglich.

Zusammenfassend betrachtet, wurden alle Todesrezeptoren, mit Ausnahme von CD95 in HuH-7-Zellen, schon innerhalb der ersten zwei Stunden SC-58635-Behandlung an der Zellmembran reguliert. Dabei war die Oberflächenexpression von CD95 in HepG2-Zellen und die Abnahme von TNF-R1 in HuH-7-Zellen besonders auffällig. Ein weiteres Merkmal von HuH-7-Zellen war die Passivität des CD95-Rezeptors, möglicherweise aufgrund der p53-Mutation. In HepG2-Zellen war die Oberflächenexpression von CD95 und TRAIL-R2 nach 24 Stunden wieder auf ihrem Ausgangsniveau.

3.5.3. Einfluss von SC-58635 auf die Sensitivität der Todesrezeptoren für ihre entsprechenden Liganden

Insgesamt wurde der Einfluss der selektiven COX-2-Inhibitoren auf die Kinetik der membranären Expression der Todesrezeptoren deutlich. Daher wurde weiter geprüft, ob SC-58635 die Todesrezeptoren für ihre korrespondierenden Liganden sensitiviert.

Die Sensitivität der Todesrezeptoren an der Zellmembran wurde nun durch Zugabe der entsprechenden Liganden im Vergleich zur Kombination des Liganden mit 100 μ M SC-58635 getestet. Dabei wurden anti-Apo-1 als Ligand für CD95, TNF α für TNF-R1 und LZ-TRAIL für TRAIL-R1 und -R2 eingesetzt. Die Anlagerung des korrespondierenden Liganden an den membranständigen Todesrezeptor führt zur Weiterleitung des Apoptosesignals über das jeweils angesprochene Rezeptorsystem (vgl. (192)). Damit erfolgt die Rezeptorstimulation über die Liganden selektiv, während SC-58635 die Rezeptorsysteme unselektiv beeinflusst, wie in Kap. 3.5.2. gezeigt wurde (s. Abb. 45). Kombiniert man aber SC-58635 mit dem Liganden, wird die Apoptoseexekution, zusätzlich zur SC-58635 vermittelten, hauptsächlich über das mit dem jeweiligen Liganden ausgewählte Rezeptorsystem bevorzugt. Die resultierende Apoptose wurde nach 24 Stunden Behandlung in der FACS-Analyse nach Nicoletti-Färbung gemessen.

Abbildung 46 veranschaulicht die Sensitivierung der Rezeptorsysteme durch selektive COX-2-Inhibition anhand der verursachten Apoptose. Verglichen mit der SC-58635-Behandlung alleine und mit der Behandlung mit den Liganden ergab die Kombination von SC-58635 mit den Liganden eine signifikante Apoptosesteigerung. Eine Ausnahme hiervon stellte die Kombination von anti-Apo-1 und SC-58635 in HuH-7-Zellen dar (Abb. 46B). Hierbei unterschied sich die Apoptosewirkung des CD95-Liganden und dessen Kombination mit SC-58635 nur unwesentlich von der Kontrollbehandlung. Dementsprechend erzeugte die CD95-Stimulation in HuH-7-Zellen keine Apoptose und die Kombination mit SC-58635 spiegelte einen reinen SC-58635-Effekt wider.

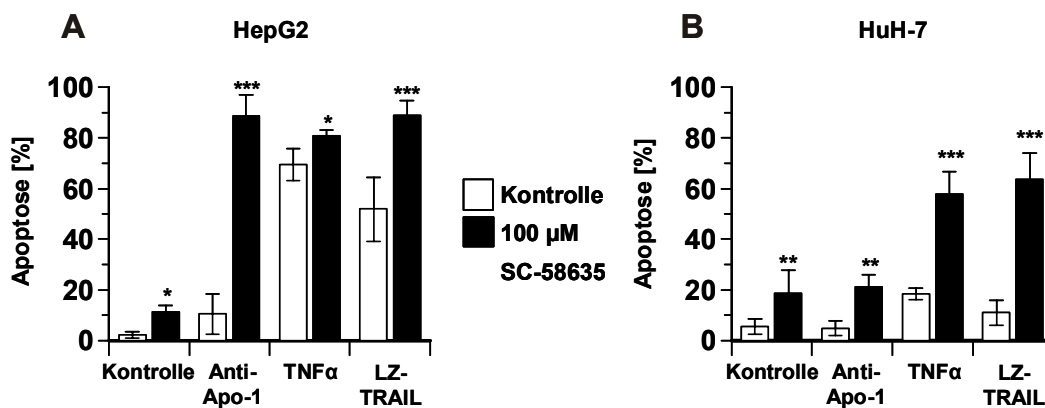


Abb. 46: Sensitivierung der Todesrezeptoren mit 100 μM SC-58635 (24 Stunden). Stimulierung der Todesrezeptoren mit ihren spezifischen Liganden: anti-Apo-1 für CD95, TNFα für TNF-R1 und LZ-TRAIL für TRAIL-R1 und -R2. Bei der Kombinationsbehandlung wurden Liganden und SC-58635 gleichzeitig für 24 Stunden zugegeben. Die Ergebnisse wurden für jede Zelllinie aus jeweils drei unabhängigen Versuchen mit je $n = 3$ gemittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Tukey-Kramer *Multiple Comparisons Test*. Der P-Wert bezieht sich auf den Vergleich der Kombinationsbehandlung (schwarz) mit der Behandlung des entsprechenden Liganden alleine (weiß). $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***). **A:** HepG2. **B:** HuH-7.

Abschließend verdeutlichten die vorgestellten Ergebnisse in Kapitel 3.5.2. und 3.5.3. die Beteiligung des extrinsischen Weges bei der SC-58635 induzierten Apoptose sowohl durch die Regulierung der Oberflächenexpression der Todesrezeptoren als auch durch die Sensitivierung der Todesrezeptorsysteme.

3.6. Einfluss der selektiven COX-2-Blockade, durch SC-58635, auf die Wirkung von Chemotherapeutika in Hepatomzellen

In neueren Arbeiten wurde die MCL-1-Expression in humanem HCC-Gewebe gezeigt. Damit einhergehend inhibierte eine erhöhte MCL-1-Expression die chemotherapeutisch induzierte Apoptose in HCC-Zellen (116, 229). Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit demonstrierten die MCL-1-Abhängigkeit während der selektiven COX-2-Inhibition. Ergänzend konnte ein rascher Abbau von MCL-1 durch SC-58635 belegt werden. Daher erschien eine Erhöhung der Chemosensitivität der Hepatomzellen durch die selektive COX-2-Blockade mit SC-58635 wahrscheinlich. Für die Analyse der Chemosensitivität wurde eine Kombinationsbehandlung der Hepatomzellen mit SC-58635 und den Zytostatika Bleomycin, Doxorubicin und Mitoxantron über 48 Stunden durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen waren jeweils nah an der therapeutisch relevanten Konzentration und dem zehnfachen davon (160, 212, 213).

Die FACS-Analyse nach Nicoletti-Färbung belegte tatsächlich in beiden Zelllinien eine signifikante Zunahme der Tumorzellapoptose, wenn Bleomycin, Mitoxantron oder Doxorubicin mit SC-58635 kombiniert wurden (Abb. 47 und 48). Zudem ergab die Kombination von SC-58635 mit Bleomycin oder mit Doxorubicin einen synergistischen Effekt nach Chou und Talalay (224) in HepG2- und HuH-7-Zellen (Abb. 47A u. B und 48A u. B).

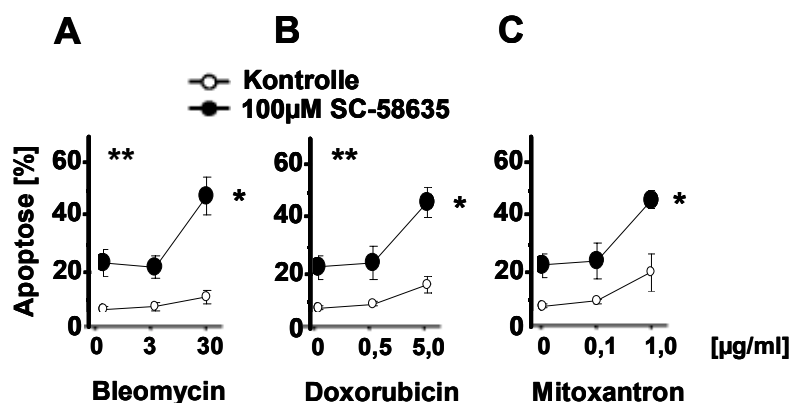


Abb. 47 SC-58635 sensitiviert HepG2-Zellen für die chemotherapeutisch induzierte Apoptose. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit Zytostatika [μg/ml] alleine (Kontrolle) und in Kombination mit 100 μM SC-58635 für 48 Stunden. Dargestellt wurden die Mittelwerte aus zwei Versuchen mit jeweils $n = 3$. Mit der *balanced two way* ANOVA wurde ein möglicher synergistischer Effekt (nach Chou und Talalay (224)) für die Kombination von SC-58635 mit Bleomycin, Doxorubicin oder Mitoxantron getestet. $P < 0,05$ (**), aufgeführt oben links im jeweiligen Diagramm. Der Verlauf der Apoptose für die Kombinationsbehandlung im Vergleich zum Verlauf der Kontrollbehandlung mit den Zytostatika alleine wurde mit MANOVA getestet. $P < 0.0001$ (*), Angabe am Graphen für die Kombinationsbehandlung (schwarze Punkte). **A:** Bleomycin. **B:** Doxorubicin. **C:** Mitoxantron.

Weiter war in HepG2- und HuH-7-Zellen die Wirkung der jeweils höheren Dosis der Chemotherapeutika selbst sehr schwach im Vergleich zur Behandlung mit SC-58635 alleine (Abb. 47 und 48). Da die Effekte in beiden Zelllinien sehr ähnlich waren, erscheint eine Abhängigkeit von WTP53 bzw. mut.p53 unwahrscheinlich. Die Ergebnisse verweisen außerdem auf die Möglichkeit der Reduktion der Zytostatika, wenn sie mit SC-58635 kombiniert werden. So könnte derselbe chemotherapeutische Effekt erzielt werden, wenn in Kombination mit SC-58635 das Zytostatikum deutlich reduziert wird. Dies wäre im Hinblick auf die Senkung von chemotherapeutisch induzierten Nebenwirkungen von großem Nutzen für Tumorpatienten.

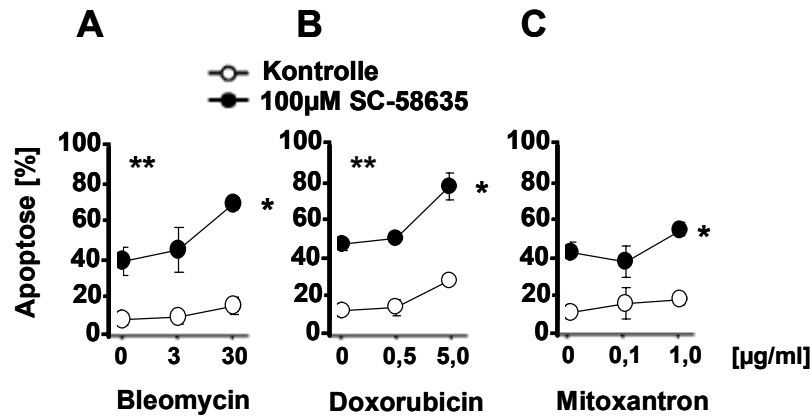


Abb. 48: SC-58635 sensitiviert HuH-7-Zellen für die chemotherapeutisch induzierte Apoptose. Die Behandlung und Auswertung erfolgte analog zur Beschreibung zu Abbildung 47. A: Bleomycin. B: Doxorubicin. C: Mitoxantron.

3.6.1. Behandlung von primären Hepatozyten mit SC-58635 alleine und in Kombination mit Zytostatika

Für eine klinische Anwendung von SC-58635 sollte aber zusätzlich die Wirkung auf gesundes Gewebe ausgeschlossen werden können. Stellvertretend dafür wurde in PHHs ein Parallelversuch analog zu den eben besprochenen Behandlungen (Abb. 47 und 48) durchgeführt.

Eine Kombinationsbehandlung mit SC-58635 und Chemotherapeutika zeigte keinerlei synergistischen Effekt bezogen auf den apoptotischen Zelltod von PHHs (Abb. 49). Außerdem war die Auswirkung der selektiven COX-2-Blockade und der Behandlung mit Zytostatika meist unter 20 % Apoptose über 48 Stunden. Damit lag die Apoptose weit unter den Werten in den Hepatomzellen, wie ein Vergleich mit den Abbildungen 47 und 48 ergibt.

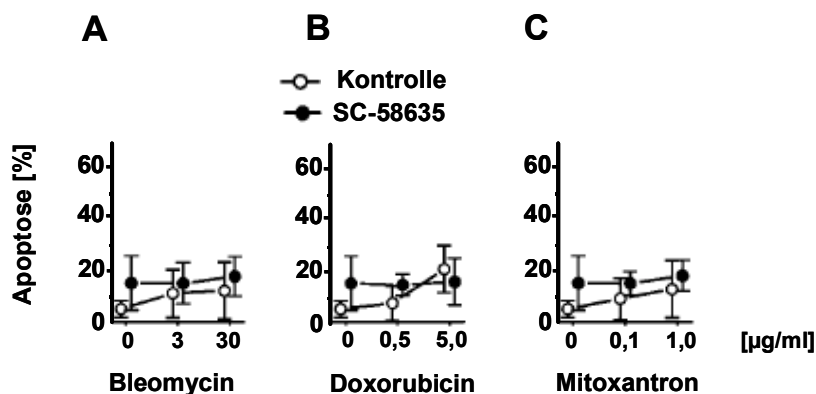


Abb. 49: Die Chemosensitivität wird nach selektiver COX-2-Inhibition in PHHs nicht erhöht. Die Behandlung primärer Hepatozyten wurde analog zur Beschreibung zu Abbildung 47 und 48 durchgeführt. Zur Verfügung standen Zellen von zwei verschiedenen Spendern. Von jedem Spender wurde je ein Versuch mit $n = 3$ in die Auswertung miteinbezogen. Die *balanced two way* ANOVA ergab $P < 0,67$. Die spontane Apoptoserate der PHH-Zellen betrug 45 % (Daten nicht gezeigt). A: Bleomycin. B: Doxorubicin. C: Mitoxantron.

Somit konnte eine selektive Wirkung der COX-2-Blockade und der durch SC-58635 erhöhten Chemosensitivität auf Hepatomzellen gezeigt werden.

3.6.2. Beteiligung des extrinsischen Signalweges in Hepatomzellen bei der Kombinationsbehandlung von SC-58635 mit Chemotherapeutika

Im Folgenden wurde getestet, ob die mittels SC-58635 in Kombination mit Zytostatika erhöhte Apoptose über den extrinsischen Signalweg vermittelt wird. Dafür wurden HepG2- und HuH-7-Zellen analog zu den in Kapitel 3.5.1. beschriebenen Experimenten mit einem Ad fadd Δ^- -Expressionsvektor oder dem Ad β -Gal-Kontrollvektor infiziert. Die Zellen mit Kontrollvektor wurden parallel zu den vorangegangenen Versuchen (Abb.47 und 48) mit SC-58635, Bleomycin, Doxorubicin oder Mitoxantron behandelt und die Apoptose bestimmt. Dem wurde die Apoptose der Zellen mit FADD Δ^- -Überexpression während der Kombinationsbehandlung gegenübergestellt.

Der Vergleich ergab eine signifikante Reduzierung der SC-58635 mediierten Sensitivierung gegenüber chemotherapeutisch induzierter Apoptose für alle getesteten Zytostatika in beiden Zelllinien (Abb. 50 und 51).

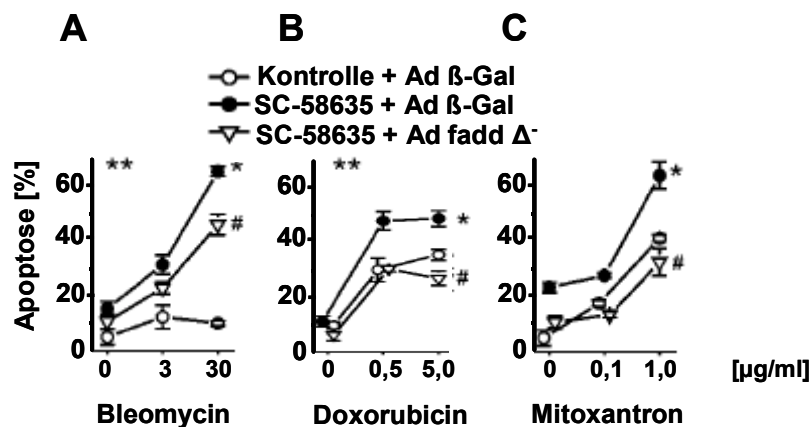


Abb. 50: FADD Δ^- reduziert die SC-58635 mediierte Chemosensitivität in HepG2-Zellen. Die Behandlung erfolgte mit Zytostatika [$\mu\text{g/ml}$] alleine oder in Kombination mit 100 μM SC-58635 für 48 Stunden in Zellen mit Ad β -Gal oder Ad fadd Δ^- . Dargestellt wurden die Mittelwerte aus einem repräsentativen Versuch von drei Versuchen mit je $n = 3$. Die *balanced two way* ANOVA testete den synergistischen Effekt für die Kombination von SC-58635 mit den jeweiligen Cytostatika in Zellen mit Ad β -gal. Angabe oben links im Diagramm mit $P < 0,05$ (**). Der Verlauf der Apoptose für die Kombinationsbehandlung im Vergleich zum Verlauf der Kontrollbehandlung mit Zytostatika alleine in Zellen mit Ad β -gal wurde mit MANOVA getestet. Angabe neben dem Graphen (schwarze Punkte), $P < 0,0001$ (*). Der FADD Δ^- -Effekt im Vergleich zur Kombinationsbehandlung mit dem Kontrollvirus wurde ebenfalls über MANOVA ausgewertet, $P < 0,0001$ (#). **A:** Bleomycin. **B:** Doxorubicin. **C:** Mitoxantron.

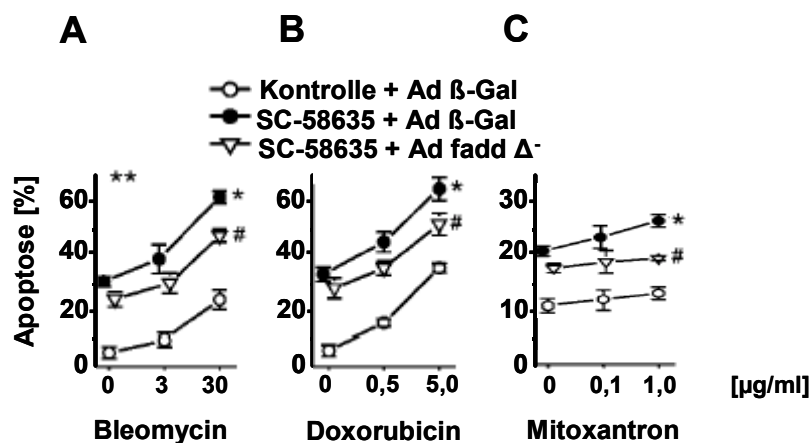


Abb. 51: FADD Δ⁻ reduziert die SC-58635 medierte Chemosensitivität in HuH-7-Zellen. Die Behandlung und Auswertung erfolgte analog zur Beschreibung zu Abb. 50. Die *balanced two way* ANOVA ergab einen synergistischen Effekt für die Kombination von SC-58635 mit Bleomycin in Zellen mit Ad β-Gal mit $P < 0,05$ (**). Der Verlauf der Apoptose für die Kombinationsbehandlung war für alle eingesetzten Chemotherapeutika signifikant im Vergleich zu der Kontrollbehandlung mit Zytostatika alleine in Zellen mit Ad β-Gal: SC-58635-Effekt gemäß MANOVA mit $P < 0,0001$ (*). Der FADD Δ⁻-Effekt wurde ebenfalls über MANOVA ausgewertet mit $P < 0,0001$ (#). **A:** Bleomycin. **B:** Doxorubicin. **C:** Mitoxantron.

Diese Ergebnisse belegten in HepG2- und HuH-7-Zellen die extrinsische Vermittlung der durch selektive COX-2-Blockade medierte Steigerung der Chemosensitivität. Diese war zudem, aufgrund der gleichen Effekte, in beiden Hepatomzelllinien unabhängig von WT- bzw. mutiertem p53.

4. Diskussion

Weltweit gehört das hepatozelluläre Karzinom zu den häufigen hochmalignen Tumorerkrankungen und zeigt eine steigende Inzidenz (1, 7, 9). Zumeist wird der Tumor erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, was die Behandlung deutlich erschwert. So können zum Beispiel nur fünf Prozent der Patienten einer operativen Therapie wie Leberteilresektion oder Lebertransplantation zugeführt werden (230). Zudem mangelt es an systemischen Therapieansätzen aufgrund der unzureichenden Chemosensitivität des HCCs (3, 5, 6, 231, 232). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Apoptosesignalwege am Modell humaner HCC-Zelllinien während der Apoptoseexekution durch selektive COX-2-Blockade mit NSAR SC-58635 herauszuarbeiten. Dies bildet die Grundlage für die Ermittlung des zugrunde liegenden Mechanismus und der möglichen Rolle der COX-2 als therapeutische Zielstruktur. Dabei wurde sowohl die intrinsische, mitochondriale als auch die extrinsische Signalvermittlung über die Todesrezeptoren deutlich. Im Zuge der Untersuchungen ergab sich eine Abhängigkeit der Apoptoseexekution sowohl von den Caspasen CASP-3, CASP-8 und CASP-9, als auch von MCL-1, einem antiapoptotischen Mitglied der BCL-2-Familie. BAX und BID, zwei proapoptotische BCL-2-Familienmitglieder, translozierten rasch an die Mitochondrien. Zudem beeinflusste SC-58635 nicht nur die Kinetik der Todesrezeptoren CD95, TNF, TRAIL-R1 und -R2 an der Zelloberfläche, sondern sensitivierte diese Todesrezeptoren auch für ihre entsprechenden Liganden. Einen vielversprechenden Ansatz zeigte die Kombination von Chemotherapeutika mit SC-58635. Die Apoptose konnte in der Kombination erhöht werden und war außerdem – im Gegensatz zu den meisten Zytostatika – unabhängig vom p53-Status der verwendeten Zelllinien.

4.1. SC-58635 induzierte Apoptose durch selektive COX-2-Inhibierung in Hepatomzelllinien

Die vorliegenden Analysen der Zellvitalität und Apoptose veranschaulichten eine zeit- und dosisabhängige Wirkung der spezifischen COX-2-Inhibierung durch SC-58635 in Hepatomzelllinien. Als ein wichtiges Kennzeichen für Apoptose gilt die Aktivierung von Caspasen (83, 233, 234), wobei insbesondere die Aktivierung der CASP-8, CASP-9 und CASP-3 in den weiterführenden Untersuchungen funktionell bestätigt werden konnte (s. dazu auch Schema Abb. 52).

Ob jedoch die von der Caspasenaktivierung begleitete Apoptoseexekution ausschließlich auf die selektive COX-2-Blockade der NSARs zurückgeführt werden kann, wird kontrovers

diskutiert (235). In den letzten Jahren wurde immer wieder über eine COX-2 unabhängige Wirkung von spezifischen COX-2-Inhibitoren berichtet. Diese Arbeiten untersuchten die Wirkung von spezifischen NSARs an COX-2 defizienten Zelllinien bzw. Tumoren. So war beispielsweise die COX-2 defiziente Kolonkarzinomzelllinie HT29 sensitiv für SC-58635 und zeigte typische apoptotische Merkmale, welche mit der Inhibition von Pyruvat Dehydrogenase Kinase, Isozym 1 (PDK1) assoziiert waren, sodass die Autoren statt dessen PDK1 als Zielprotein diskutierten (236). Eine andere vergleichende Analyse einer COX-2 defizienten und einer COX-2 exprimierenden Kolonkarzinomzelllinie ergab sowohl COX-2 abhängige als auch unabhängige Effekte nach SC-58635-Behandlung. Beide Zelllinien waren sensitiv für die SC-58635 induzierte Apoptose, die COX-2 defizienten Zellen allerdings geringer. Daneben wiesen beide Zelltypen gleiche Merkmale in Bezug auf die SC-58635 induzierte G₀/G₁-Blockade auf. Diese Ergebnisse sprachen sowohl für eine COX-2 abhängige als auch unabhängige Reaktion (237).

Dagegen gibt es eine Vielzahl von Hinweisen für COX-2 abhängige Effekte der COX-2 spezifischen NSARs. So wurde im APC (*adenomatosis polyposis coli*) delta716 *knock out* (k.o.) Mausmodell für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) die COX-2-Abhängigkeit der spezifisch hemmenden NSARs demonstriert. Bei einer zusätzlichen Nullmutation für das COX-2-Gen war die Anzahl und Größe der intestinalen Polypen deutlich reduziert. Die selektive COX-2-Blockade reduzierte die Anzahl der Polypen in den APC delta716 k.o. Mäusen ähnlich stark wie die COX-2-Nullmutation. Zudem war dieser Effekt im Vergleich zur Behandlung der Mäuse mit dem unspezifischen COX-2-Inhibitor, Sulindac, weitaus stärker (238, 239). Weitere direkte COX-2-Effekte wurden in Kolonkarzinomzelllinien mit (HCA-7) und ohne COX-2-Expression (HCT116) und deren Xenograft-Modellen in Nacktmäusen dargestellt. Eine Behandlung mit SC-58635 führte nur in den HCA-7-Xenograften zur Verringerung der Tumorgröße bzw. in der HCA-7-Zellkultur zu einem deutlich verminderten Wachstum (74). In Kolonkarzinom- und HCC-Zelllinien konnten die apoptotischen Effekte der selektiven COX-2-Blockade mittels SC-58635 durch Zugabe von PGE₂, dem Endprodukt der Prostaglandinsynthese, wieder aufgehoben werden (43, 45, 240). In der vorliegenden Arbeit verhinderte die Zugabe von PGE₂ die Depolarisierung des mitochondrialen Potentials. Damit wurde zusätzlich zu früheren Arbeiten (45) ein weiterer Hinweis auf die COX-2 abhängige Wirkung von SC-58635 in HCC-Zelllinien gefunden.

Dennoch besteht die Möglichkeit, dass SC-58635 über alternative Wirkmechanismen in HCC-Zellen agiert, wie es auch von Leng et al. postuliert wurde (43). Denkbar wäre beispielsweise ein direkter Einfluss im Bereich der Todesrezeptoren (235), da diese in den

Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bereits ab einer Stunde selektiver COX-2-Blockade aktiviert wurden.

In den durchgeführten Vitalitäts- und Apoptoseversuchen wurde für das NSAR SC-58635 eine Arbeits-Konzentration von 100 μM ermittelt. Dies ist eine vergleichsweise hohe Dosis, da die humantherapeutisch relevante Konzentration bezogen auf die Einzeldosis von 800 mg SC-58635 zwischen 3 bis 5 μM im Blutserum liegt (241). Allerdings ist die Konzentration im Gewebe und in den Zellen selbst unbekannt. Die Zellkulturen stellen ein artifizielles System dar, in dem der Wirkstoff jeweils nur einmal zugegeben wurde und nicht, wie in einer Therapie, oft mehrmals täglich. In weiterführenden Arbeiten an Mäusen mit HCC-Zellimplantaten konnte die apoptotische Wirksamkeit von Meloxicam, einem SC-58635 verwandten NSAR, in geringerer Konzentration *in vivo* gezeigt werden (67).

4.2. Charakterisierung des intrinsischen Signalweges über die Mitochondrien nach selektiver COX-2-Blockade

Die Daten zur Aktivierung der CASP-9 gaben den ersten Hinweis auf eine intrinsische Signalvermittlung, über die Mitochondrien, nach selektiver COX-2-Blockade. In zeitlicher Korrelation wurde dies in weiteren Analysen, welche eine Depolarisierung der Mitochondrienmembranen und CYT-C-Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma, ergaben, bestätigt. Zur Aufklärung des Mechanismus der mitochondrialen Aktivierung wurden einzelne Mitglieder der BCL-2-Familie, wie BAX, wegen der beobachteten Depolarisierung der Membranen und des CYT-C-Ausstroms, MCL-1 und BID, aufgrund des Einflusses der CASP-3 und CASP-8 auf die Mitochondrien, weiter untersucht.

4.2.1. Relevanz des antiapoptotischen MCL-1-Proteins im SC-58635 induzierten Apoptosesignalweg

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Abbau von MCL-1 und seine funktionelle Relevanz während der SC-58635 induzierten Apoptose in Hepatomzellen gezeigt. Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre berichteten ebenfalls über eine Herunterregulierung bzw. Elimination von MCL-1 bei Apoptose. Vertretend hierfür seien die Arbeiten von Perez-Galan und Marzo erwähnt (242, 243). Sie zeigten den Abbau von MCL-1 in Jurkat-Zellen nach TRAIL induzierter Apoptose und in HeLa-Zellen nach Bestrahlung. In B-Zellen und in Myeloma-Zellen wurde der MCL-1-Abbau bei Apoptose durch Behandlung mit einem Farnesyltransferaseinhibitor demonstriert. Lin et al. erläuterten die Rolle von MCL-1 im

Lungenkarzinom in Zusammenhang mit dem COX-2-Signalweg (199). Nach stabiler Transfektion von COX-2 wurde MCL-1 innerhalb von zwei bis vier Stunden auf Proteinebene hochreguliert. Bei Inhibierung der COX-2 durch SC-58635 wurde MCL-1 entsprechend herunterreguliert. Auffallend in der vorliegenden Arbeit war jedoch eine kurzfristige Zunahme von MCL-1 im Gesamtprotein innerhalb der ersten 30 Minuten nach Apoptoseinduktion. Aufgrund der raschen Bereitstellung läge der Schluss nahe, dass MCL-1 außerhalb der Mitochondrien sehr schnell, möglicherweise über Dephosphorylierung (114, 119), zur Verfügung gestellt wird. Aufgrund der schnellen Zeitabläufe wäre eine Bereitstellung auf der Regulationsebene der Transkription eher unwahrscheinlich. Bei der gezeigten vorübergehenden Zunahme von Mcl-1 könnte es sich um eine Gegenregulation handeln, die erst in einem zweiten Schritt, nach weiterem Einwirken apoptotischer Signale, gestoppt wurde. Dieses Phänomen wurde in der Vergangenheit nach den unterschiedlichsten Methoden der Apoptoseinduktion, wie Bestrahlung (126) oder dem Einwirken zytotoxischer Substanzen (121, 124, 125) berichtet.

Dagegen zeigten die vorliegenden Analysen der mitochondrialen Proteinfraction, dass MCL-1 in den Mitochondrien sofort abgebaut wurde, was auf die Inhibition des PI3K/AKT Weges durch selektive COX-2-Blockade zurückgeführt werden könnte. Dieser Signalweg wird unter anderem durch die Bindung von PGE₂ an die entsprechenden Prostaglandinrezeptoren induziert (21, 225, 244, 245) und verhindert den Abbau von MCL-1 in den Mitochondrien. Bei der selektiven COX-2-Blockade dagegen wird die Bildung von PGE₂ blockiert, wodurch die Prostaglandinrezeptoren nicht besetzt werden und somit der PI3K/AKT-Signalweg nicht aktiviert werden kann. So demonstrierten Fleischer et al. die Reduktion von MCL-1 mittels eines spezifischen PI3K-Inhibitors in HCC-Schnittgewebe und Hepatomzellen (116).

Für den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Einfluss der CASP-3 auf die Depolarisierung der Mitochondrienmembran wurde MCL-1 als mögliches Ziel dieser Caspase angenommen (129-132). Würde aber das antiapoptotische MCL-1 durch CASP-3 gespalten werden, wäre das Spaltprodukt ein BH-3-*only*-Protein mit proapoptotischen Eigenschaften (117, 118, 228). Bei Apoptoseinduktion mit SC-58635 sollte dementsprechend ein durch Überexpression erzeugtes großes Angebot an MCL-1, das in der Folge als Substrat der CASP-3 zur Verfügung steht, die Apoptose verstärken. Im anderen Fall sollte eine Blockierung von MCL-1 die Apoptoseexekution abschwächen. Die vorliegenden Untersuchungen erhärteten aber die ursprünglich antiapoptotische Funktion von MCL-1, da seine Überexpression die Apoptose der Hepatomzellen reduzierte und eine MCL-1-Inhibition die SC-58635 induzierte Apoptose verstärkte. Damit würde MCL-1 als Substrat der CASP-3 ausscheiden. Als ein

weiterer möglicher Angriffspunkt der CASP-3 wird in der Literatur die p75-Einheit des Komplex I in der Elektronentransportkette der Mitochondrien diskutiert (246) (s. dazu auch Schema Abb. 52). Aufgrund des CASP-3-Einflusses auf die Mitochondrienaktivierung würde eine positive Rückkopplung über die CYT-C-Freisetzung mit darauf folgender CASP-9-Spaltung, welche wiederum CASP-3 aktiviert, stattfinden (s. Abb. 52).

4.2.2. Beteiligung von BAX im intrinsischen Signalweg nach selektiver COX-2-Blockade

In den durchgeführten Analysen konnte die Verlagerung von BAX an die Mitochondrien in beiden Hepatomzelllinien klar gezeigt werden. Diese Translokation geschah zeitnah zu der Depolarisierung der Mitochondrienmembranen, dem CYT-C-Ausstrom und dem mitochondrialen Abbau von MCL-1. In HuH-7-Zellen war die Translokation von BAX an die Mitochondrien nach vier Stunden SC-58635-Behandlung maximal. Die kurzfristige Gegenregulierung von MCL-1 innerhalb der ersten 30 Minuten SC-58635 Behandlung konnte in beiden Zelllinien die BAX-Translokation an die Mitochondrien nicht verhindern.

Eine möglicher Auslöser für die BAX-Translokation könnte die durch die selektive COX-2-Blockade verhinderte Bindung von PGE₂ an die Prostaglandinrezeptoren EP1 und EP2, welche beide in HepG2- und HuH-7-Zellen exprimiert werden, sein. Da vor allem durch EP2 und EP4, über die folgende Induktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), der PI3K/AKT-Signalweg angeregt wird (21, 244), würde dieser in der Folge inhibiert werden. Auf diese Weise würde die durch den PI3K/AKT-Weg veranlasste Blockade der BAX-Translokation an die Mitochondrien aufgehoben werden (247). In früheren Arbeiten konnte in HuH-7-Zellen eine signifikante Abnahme des Phosphorylierungsstatus von AKT ab zwei Stunden nach selektiver COX-2-Blockade durch SC-58635 gezeigt werden (45). Parallel dazu war in HuH-7-Zellen die BAX-Translokation am stärksten nach vier Stunden. Diese beiden Ergebnisse könnten in Ergänzung ein Hinweis auf den Einfluss von AKT auf die BAX-Translokation sein. Durch die SC-58635 induzierte selektive COX-2-Blockade, der damit verhinderten Anlagerung von PGE₂ an die Prostaglandinrezeptoren und der konsekutiven Inhibierung des PI3K/AKT-Signalweges könnte somit BAX ungehindert ans Mitochondrium translozieren (Schema, Abb. 52).

4.2.3. Beteiligung von BID im intrinsischen Signalweg nach selektiver COX-2-Blockade

Ein gängiges Modell der Funktion von BID ist seine Rolle als Mediator zwischen ex- und intrinsischem Signalweg. BID wird durch die aktivierte Casp-8 gespalten in *truncated* BID (tBID), welches als 15 kDa großes Protein vom Zytoplasma an die Mitochondrien transloziert (88, 136, 145, 150). Dort bewirkt es die Aktivierung von BAX, welches in der Folge für die Porenöffnung bzw. VDAC-Kanalöffnung der Mitochondrienmembran verantwortlich ist (88, 109, 136, 145).

Entgegen der Erwartung konnte in der vorliegenden Arbeit tBID weder im Gesamtproteinlysate noch in der mitochondrialen Proteinfraction der beiden Hepatomzelllinien detektiert werden. BID translozierte nach selektiver COX-2-Blockade ausschließlich als Vollängen-BID (v.L. BID) an die Mitochondrien. Im Gegensatz zu der häufig in der Literatur beschriebenen BID-Spaltung und Verlagerung von tBID an die Mitochondrien gab es immer wieder Berichte, die die Translokation von v.L.BID-Proteins belegten. So beschrieben Valentijn und Gilmore die Translokation von v.L.BID während einer speziellen Form der Apoptose, der Anoikis (248). Dabei handelt es sich um eine Sonderform der Apoptose, in der die Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix verloren geht. Andere Autoren zeigten in Jurkat- und HeLa-Zellen den Verlauf der CD95 mediierte Apoptose über tBID. Wurde aber CASP-8 blockiert und damit die BID-Spaltung, wich das System auf die Translokation von Vollängen-BID aus (249). König und Kollegen beobachteten in Rattenneuronen die Translokation v.L.BID bei excitotoxischer (durch Übererregung induzierte) Apoptose gezeigt (250). Als weiteres Beispiel für die Verlagerung von v.L.BID an die Mitochondrien wurde nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin in HeLa-Zellen beobachtet (136). An den Mitochondrien bindet v.L.BID an BAX, wodurch die Konformationsänderung von BAX induziert wird. Unklar ist, wodurch v.L.BID zur Translokation veranlasst wurde. Tafani et al. schlugen als mögliche Auslöser der Translokation eine Konformationsänderung von BID oder eine durch Ceramid induzierte Änderung der Lipidzusammenstellung in den Mitochondrienmembranen selbst vor (249). Auch ein Zusammenwirken beider Mechanismen wäre den Autoren zufolge möglich.

In Anbetracht der fehlenden BID-Spaltung würde ein vom extrinsischen Signalweg ausgehender Einfluss über die CASP-8 auf BID ausscheiden. Das würde die Sonderstellung von BID als Mittler zwischen den ex- und intrinsischen Signalwegen ausschließen, womit die Verbindung über einen anderen Knotenpunkt erfolgen müsste. Denkbar wäre als möglicher

Kandidat, *downstream* der CASP-8, CASP-3, deren Substrat auch die p75-Einheit des Komplex I der Atmungskette sein kann (246). Zudem wird CASP-3 sowohl durch CASP-8, von der extrinsischen Seite her, als auch von CASP-9, von den Mitochondrien ausgehend, aktiviert. Mit diesem Modell ließe sich auch der Einfluss von CASP-8 und CASP-3 auf die Depolarisation der Mitochondrienmembran erklären (Abb. 52).

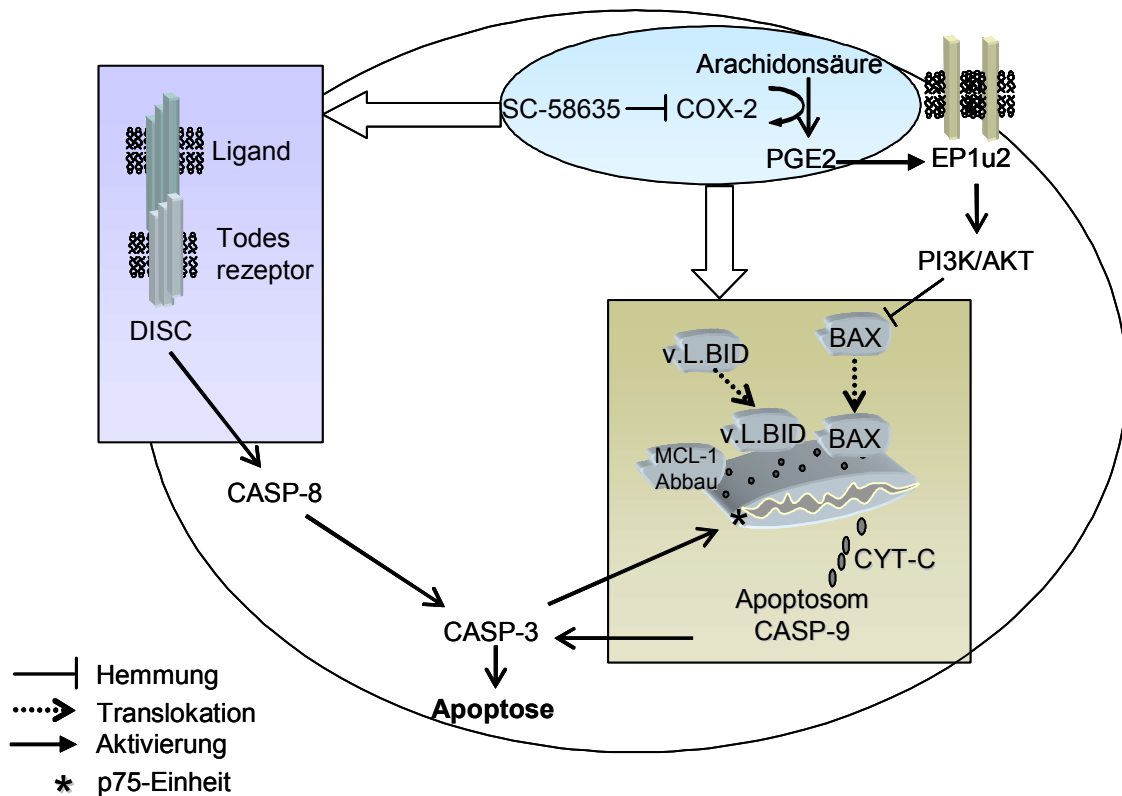


Abb. 52: Modellvorstellung. Die selektive COX-2-Blockade, induziert durch SC-58635, führt zur Caspasenspaltung und Aktivierung der Mitochondrien über Mitglieder der BCL-2 Familie. **A:** Die selektive COX-2-Blockade beeinflusst den intrinsischen Apoptoseweg über die Mitochondrien und den extrinsischen Signalweg über die Todesrezeptoren. **B:** Die Mitochondrienaktivierung war beeinflusst von CASP-8 und CASP-3. Der Einfluss der CASP-8 wurde dabei nicht über die BID-Spaltung ausgeübt. MCL-1 konnte als Substrat der CASP-3 ausgeschlossen werden. Möglicherweise übt CASP-8 seinen Einfluss auf die Mitochondrien über CASP-3 aus. Ein mögliches mitochondriales Substrat der CASP-3 könnte die p75-Einheit des Komplex I in der Elektronentransportkette (abgebildet mit *) sein (246). Somit könnte CASP-3 und nicht BID bzw. tBID als Mediator zwischen extrinsischem und intrinsischem Signalweg wirken. Außerdem würde durch den Einfluss der CASP-3 auf die Mitochondrienaktivierung eine positive Rückkopplung über die Freisetzung von CYT-C, konsekutiver Spaltung der CASP-9, welche wiederum CASP-3 spaltet, erzeugt werden. Ergänzend zu Vorarbeiten (45) könnte die BAX-Translokation auf die durch SC-58635 induzierte AKT-Inhibierung zurückgeführt werden. Vollängen-BID (v.L.BID) translozierte, möglicherweise aufgrund einer Konformationsänderung oder Änderung der Lipidzusammensetzung der Mitochondrienmembranen, an die Mitochondrien (249). Die Apoptose war außerdem abhängig vom Abbau des antiapoptotischen MCL-1, der ebenfalls in einer AKT-Inhibierung begründet sein könnte, s. (116). **C:** Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges s. Abb. 53.

4.3. Charakterisierung des extrinsischen Signalweges über die Todesrezeptoren

Die vorliegenden Ergebnisse zur CASP-8-Aktivierung deuteten auf eine extrinsische Signalvermittlung über die Todesrezeptoren, da die CASP-8-Spaltung eng mit der Protein-Protein-Interaktion von ProCASP-8 mit FADD verbunden ist (92, 156). Bei der Aktivierung der Todesrezeptoren CD95 und TRAIL-R1 und -R2 bindet FADD (165) intrazellulär an die jeweiligen Todesdomänen der Rezeptoren, wodurch der DISC-Komplex gebildet wird. Dagegen wird FADD während der Aktivierung von TNF-R1 an den apoptotisch wirksamen Komplex II ("TRADDosom") gebunden (156). Somit stellt FADD ein zentrales Protein der apoptosevermittelnden Komplexe an den Todesrezeptoren dar (s. dazu auch Schema Abb. 53).

Dementsprechend sollte eine Blockade von FADD die weitere, von den Todesrezeptoren ausgehende, Signalvermittlung stoppen, was in der Folge zu einer Reduktion der Apoptose führt. Als Inhibitor der FADD-Expression wird experimentell häufig durch adenoviralen Gentransfer oder Transfektion ein fadd Δ^- -Konstrukt mit fehlender Todeseffektordomäne in die Zellen eingebracht. So konnte, wie Tietze et al. zeigten, in HuH-7-Zellen die TNF vermittelte Apoptose mit Hilfe des adenoviralen Gentransfers von Ad fadd Δ^- signifikant reduziert werden (29). In einer anderen Arbeit wurde die durch TRAIL-R2 und CD95 vermittelte Apoptose in EBNA/CV1-Zellen ebenfalls durch die Transfektion eines fadd Δ^- -Konstruktes deutlich gesenkt (154). In der vorliegenden Arbeit wurde die SC-58635 induzierte Apoptose über den adenoviralen Gentransfer von Ad fadd Δ^- ebenfalls signifikant im Vergleich zu Zellen mit Kontrollvektor reduziert. Somit konnte der über die Aktivierung der CASP-8 erhaltene Hinweis auf die extrinsische Signalvermittlung nach selektiver COX-2-Blockade, weiter verifiziert werden.

Zudem wurden aufgrund der Blockade der FADD-Expression die Mitochondrienmembranen signifikant weniger depolarisiert als in Zellen mit Kontrollvektor. Damit zeigte sich ein Einfluss des extrinsischen Signalweges auf den intrinsischen Signalweg über die Mitochondrien. Bei der SC-58635 induzierten Apoptose in B-Lymphom-Zellen mit stabilem FADD Δ^- und in FADD defizienten Jurkat-Zellen wurde dagegen gezeigt, dass FADD keinen Einfluss auf das Apoptosegeschehen hatte. In der Konsequenz konnten die Autoren eine rein mitochondrial vermittelte Apoptose durch SC-58635 in diesen Zellen belegen (251). In einer nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinie konnte die Induktion von TRAIL-R1 und -R2 durch SC-58635 gezeigt werden. In Übereinstimmung damit konnte die Überexpression von FADD Δ^- die Apoptose reduzieren, nicht aber die Überexpression des antiapoptotischen, dem

intrinsischen Signalweg angehörenden, BCL-2. Daraus schlossen die Autoren auf eine rein intrinsische Signalvermittlung in dieser Zelllinie durch SC-58635 (252). Unter Berücksichtigung dieser Berichte und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erscheint es möglich, dass SC-58635 in unterschiedlichen Zellsystemen jeweils den extrinsischen oder intrinsischen Signalweg alleine, oder beide Signalwege, möglicherweise auch in Abhängigkeit voneinander, aktivieren kann.

4.3.1. Kinetik und Sensitivierung des CD95-Rezeptors

Aus Versuchen zur Apoptoseinduktion mit Chemotherapeutika ist die Hochregulierung des CD95-Rezeptor-Ligand-Systems in der HepG2-Zelllinie bekannt (160, 191). HepG2-Zellen zeichnen sich durch Wtp53, welches als Transkriptionsfaktor für den CD95-Rezeptor fungiert, aus. Dagegen sind HuH-7-Zellen aufgrund ihres mutierten p53 nicht in der Lage, das CD-95-Rezeptor -System zu aktivieren (189).

In der vorliegenden Arbeit hatte, passend zum mutierten p53-Status der HuH-7-Zellen, die selektive COX-2-Blockade keinen Einfluss auf die Regulierung des CD95-Rezeptors an der Außenmembran in dieser Zelllinie. Der Rezeptor wurde nicht hochreguliert und die Stimulierung mit dem korrespondierenden Liganden anti-Apo-1 verursachte keine Apoptose. Die Kombination von SC-58635 und dem CD95-Liganden stellte lediglich die SC-58635-Apoptose dar. Dagegen hatte SC-58635 in HepG2-Zellen mit Wtp53 die CD95-Rezeptoren an der Zellmembran transient hochreguliert. Parallel dazu wurde die Apoptose über den mit seinem Liganden anti-Apo-1 aktivierten CD95-Rezeptor in Kombination mit SC-58635 signifikant gesteigert. Somit konnte auch in der SC-58635 induzierten Apoptose die Abhängigkeit der Aktivierung des CD95-Rezeptors von Wtp53 in Hepatomzellen demonstriert werden (s. dazu Schema, Abb. 53).

Interessant war in diesem Zusammenhang die rasche Rekrutierung dieses Rezeptors innerhalb von ein bis zwei Stunden an die Zellmembran von HepG2-Zellen. Das schnelle Erscheinen des CD95-Rezeptors an der Zelloberfläche würde eine transkriptionelle Regulierung von CD95 ausschließen und auf eine transkriptionsunabhängige Regulierung hinweisen. Trotzdem demonstrierte die Gegenüberstellung der Zelllinien mit Wtp53 und mutiertem p53 den wichtigen Einfluss dieses Transkriptionsfaktors, der normalerweise die Proteinbiosynthese des CD95-Rezeptors reguliert. Die kurzfristige Rekrutierung von CD95 könnte aus dem bestehenden Vorrat des Rezeptors in den Golgi-Vesikeln erfolgen (152). In VSMC (*vascular smooth muscle cells*)-Zellen wurde ebenfalls der Einfluss von p53 auf die Regulierung der membranären Präsenz von CD95 dargestellt. Auch in dieser Untersuchung handelte es sich

um eine rasche transiente Rekrutierung des Rezeptors an der Membran, welche mit Apoptose korreliert war. Eine Manipulation des Rezeptor-Liganden-Systems mit Antagonisten oder Agonisten war nur innerhalb der ersten vier Stunden nach Apoptoseinduktion mittels aktivem p53 wirksam. Zu späteren Zeitpunkten konnte die Apoptose über CD95 nicht mehr beeinflusst werden (151). In B- und T-Zellen mit Typ I- Apoptose wurden bereits zehn Minuten nach Zugabe des CD95-Liganden, CASP-3 und CASP-8 gespalten. In Typ II-Zellen erfolgte die Spaltung ebenfalls früh nach 60 Minuten. Auch dies deutete auf die rasche transkriptionsunabhängige Aktivierung des CD95-Rezeptors (167). Walczak und Kollegen dagegen diskutierten als Kontrollpunkt der CD95 vermittelten Apoptose die Transkription des CD95-Liganden (154). So demonstrierten Autoren einer anderen Arbeit die Hochregulierung der CD95-mRNA und parallel dazu die Erhöhung der membranären Expression des Rezeptors durch Cisplatin und Interferon γ innerhalb 48 Stunden in der Kolonkarzinomzelllinie HT29 (191). Ebenfalls auf eine transkriptionelle Regulation war die Apoptose durch Bleomycin in HepG2-Zellen zurückzuführen. Diese Zelllinie, nicht aber HuH-7-Zellen mit mutiertem p53 und Hep3B, negativ für p53, exprimierten den Rezeptor und den Liganden innerhalb 24 Stunden Bleomycinbehandlung. Parallel dazu sensitivierte Bleomycin HepG2-Zellen für die Apoptose über das CD95-Liganden-System, während HuH-7- und Hep3B-Zellen immun gegen die Kombination von Bleomycin mit anti-Apo-1 waren (160). In Saos2 (Osteosarkomzellen) wurde CD95 in Abhängigkeit von p63, einem Mitglied der p53 Familie, ab zwölf Stunden auf DNA- und Proteinebene hochreguliert. Ad TAp63 α bewirkte innerhalb 72 Stunden einen Anstieg des membranären CD95-Rezeptors in der Hepatomzelllinie Hep3B (212). Offenbar wird CD95 nicht nur in unterschiedlichen Zelllinien transkriptionsabhängig oder transkriptionsunabhängig – und damit schnell – reguliert. Möglicherweise beeinflussen auch unterschiedliche Wirkstoffgruppen, wie z.B. Chemotherapeutika oder NSARs, in denselben Zelllinien die transkriptionelle Abhängigkeit und damit die Geschwindigkeit der CD95-Regulation.

4.3.2. TRAIL-R1 und TRAIL-R2 in der SC-58635 induzierten Apoptose

In der vorliegenden Arbeit sensitivierte SC-58635 das TRAIL-Rezeptorsystem in HepG2- und HuH-7-Zellen, was sich in einer Apoptosesteigerung bei der Kombination von SC-58635 mit LZ-TRAIL (Ligand für TRAIL) ausdrückte. Da der TRAIL-Ligand selbst in der Lage zur tumorspezifischen Apoptoseinduktion ist, ist seine Verwendung daher von potentiell therapeutischen Interesse (253, 254). Die Wirkung von TRAIL in Hepatomzellen ist jedoch bislang umstritten. Verschiedene Autoren berichteten von einer Resistenz der Zellen gegen TRAIL, welche aber in Kombination mit Actinomycin-D (255) oder der Blockade von NFκB (256) aufgehoben werden konnte. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen setzten die Autoren TRAIL in einer Konzentration von nur 100 ng/ml ein. Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Analysen basieren dagegen auf einer Konzentration von 1 µg/ml LZ-TRAIL. Da SC-58635 das TRAIL-System sensitivieren konnte, wäre unter therapeutischen Gesichtspunkten in einer Kombinationsbehandlung eine Reduktion der TRAIL-Ligand- und eventuell der SC-58635-Konzentration denkbar. Ganten et al. veranschaulichten eine mittels TRAIL-Ligand (1µg/ml) induzierte Apoptose in HepG2-Zellen, konnten diese aber nicht in Hep3B-Hepatomzellen zeigen (192). Dagegen bewirkte in diesen Zellen die Zugabe des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil (5-FU) eine Sensitivierung der TRAIL-Ligand induzierten Apoptose. Dem wurde das Verhalten von HepG2-Zellen und speziell auf TRAIL-Resistenz selektionierten HepG2-Zellen gegenübergestellt, welche in ähnlicher Weise eine Sensitivierung durch 5-FU erfuhren. Unter Berücksichtigung dieser Daten und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte TRAIL-Ligand mit der Konzentration von 1 µg/ml in wenigen Hepatomzelllinien, wie HepG2 und – wenn auch schwach ausgeprägt – HuH-7, eine apoptotische Wirkung erzielen. Zudem konnte durch SC-58635 eine weitere Sensitivierung für bereits TRAIL sensitive HepG2-Zellen und weniger TRAIL sensitive HuH-7-Zellen erreicht werden.

Aufschlussreich war in der Arbeit von Ganten und Kollegen der zugrunde liegende Mechanismus der Sensitivierung der untersuchten Hepatomzellen durch 5-FU für die TRAIL induzierte Apoptose (192). So zeigten die Autoren hauptsächlich eine deutliche Hochregulierung von TRAIL-R2 und dagegen eine sehr gering ausgeprägte Hochregulierung von TRAIL-R1 an der Zelloberfläche. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden TRAIL-R1 und -R2 in beiden Zelllinien nach selektiver COX-2-Blockade gegensätzlich an der Zellmembran reguliert. Generell war in beiden unbehandelten Hepatomzelllinien TRAIL-R1 vergleichsweise schwach an der Membranoberfläche vertreten und nahm im Verlauf der

SC-58635-Behandlung über 24 Stunden weiter ab. TRAIL-R2 dagegen wurde in etwa 50 % der unbehandelten Zellen beider Zelllinien an der Zellmembran detektiert. Durch SC-58635 nahm TRAIL-R2 innerhalb einer Stunde in HepG2-Zellen transient ab und in HuH-7-Zellen kurzfristig zu. Dabei fiel auf, dass die Abnahme in HepG2-Zellen mit dem Anstieg von CD95 und die Zunahme in HuH-7-Zellen mit der Herunterregulierung von TNF-R1 korreliert war. Im weiteren Behandlungsverlauf blieb TRAIL R2 jedoch weitestgehend stabil auf dem Ausgangsniveau unbehandelter Zellen an der Zelloberfläche.

Dagegen konnten Kim et al. in PLC/PRF/5-Hepatomzellen eine Sensitivität für den TRAIL-Liganden über die Aktivierung beider TRAIL-Rezeptoren, TRAIL-R1 und -R2, bei der Apoptoseexekution belegen (256). In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen induzierte SC-58635 den extrinsischen Apoptoseweg und sensitivierte die Zellen für den TRAIL-Liganden. In diesen Untersuchungen wurde die TRAIL-R2-mRNA bereits nach sechs Stunden hochreguliert. TRAIL-R1 wurde jedoch im Gegensatz zu TRAIL-R2 schwächer exprimiert (252). Dagegen reichte in Melanomzellen TRAIL-R2 zur Apoptosevermittlung durch LZ-TRAIL aus (257). TRAIL-R1 war zwar ebenfalls in der Lage Apoptose zu vermitteln, wurde dazu aber nicht notwendigerweise benötigt (257).

Demnach wäre eine Zunahme des TRAIL-R2-Rezeptors generell für die Apoptoseweiterleitung wichtiger als eine mögliche Zunahme des TRAIL-R1-Rezeptors. Dementsprechend würde in HuH-7-Zellen die rasche transiente Hochregulierung von TRAIL-R2 in der ersten Stunde SC-58635-Behandlung den entscheidenden Auslöser zur Weiterleitung des Apoptosesignals über TRAIL-R2 darstellen. Die transiente Abnahme von TRAIL-R2 in HepG2-Zellen lässt sich in diesem Zusammenhang nur schwer erklären. Eventuell könnte aber die darauf folgende Zunahme und anschließende Stabilisierung des Rezeptors an der Zelloberfläche maßgebend für die TRAIL-R2-Sensitivierung sein. Aus der Reduzierung von TRAIL-R1 könnte eine möglicherweise eher antiapoptotische Funktion dieses Rezeptors, wie sie auch für HaCaT-Keratinocyten berichtet wurde (258), abgeleitet werden. Dazu passend fällt die wesentlich höhere Apoptose durch LZ-TRAIL in HepG2-Zellen mit niederem TRAIL-R1-Status der unbehandelten Zellen auf. Parallel dazu ist die apoptotische Wirkung des TRAIL-Liganden in HuH-7-Zellen mit einem dreifach höheren TRAIL-R1-Status wesentlich geringer. Das würde bedeuten, je mehr TRAIL-R1 an der Zelloberfläche exprimiert ist, desto geringer ist die Apoptose und umgekehrt.

4.3.3. Regulierung und Sensitivierung des TNF-R1

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Aktivierung und Grundpräsenz des TNF-R1 (s. dazu Abb. 53) ergaben ein vollkommen anderes Bild als die Aktivierung von CD95, TRAIL-R1 und -R2. Zunächst war die Präsenz des TNF R1 an der Zelloberfläche unbehandelter HuH-7-Zellen mit mutiertem p53 mehr als dreimal so hoch als in unbehandelten HepG2-Zellen mit WTp53. Da TNF-R1 auch antiapoptotische Eigenschaften hat (168), könnte dies ein möglicher Hinweis auf eine besondere Malignität von HuH-7-Zellen sein.

Weitere Daten der vorliegenden Arbeit belegten eine kontinuierliche Abnahme der TNF R1-Rezeptoren an der Zelloberfläche während 24 Stunden SC-58635-Behandlung in beiden untersuchten Hepatomzelllinien. Wobei diese Abnahme in HepG2-Zellen gering war, in HuH-7-Zellen vergleichsweise stark ausgeprägt war. Dagegen wurde in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 die Apoptosevermittlung, welche durch die Überexpression von p27^{Kip1} induziert wurde, über die Hochregulierung von TNF-R1 an der Zelloberfläche gezeigt. (259). In einer anderen Arbeit von Schütze et al. wurde die TNF induzierte Internalisierung von TNF-R1 mit Monodansylcadaverin (MDC) in der Lymphomzelllinie U937 blockiert. Die fehlende Endozytose von TNF R1 hatte keine Auswirkung auf die CD95 vermittelte Apoptose, dagegen war eine mehr als dreifache Abnahme der TNF induzierten Apoptose die Folge (260). In einer weiteren Arbeit von Schneider-Brachert et al. wurde die Internalisierung als Voraussetzung für Apoptose mittels Blockade der endozytotisch relevanten Regionen des Rezeptors bestätigt. Die Autoren konnten außerdem eine rasche Abnahme der Zellvitalität und Apoptose mit der Endozytose korrelieren. Parallel dazu wurde die autoproteolytische Spaltung der CASP-8 innerhalb zehn Minuten demonstriert (261). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse (260, 261) stellt die Internalisierung von TNF-R1 nicht nur eine Folge der Anregung des Rezeptors, sondern auch eine Voraussetzung für die Weiterleitung von Apoptosesignalen dar (s. dazu Schema, Abb. 53). Auch die, vor allem für HuH-7-Zellen, ermittelten Daten der vorliegenden Arbeit, sprechen für diesen Mechanismus bei der *in vitro*-Apoptose durch SC-58635 induzierte selektive COX-2-Blockade. Möglicherweise handelt es sich bei der Hochregulierung des TNF R1-Rezeptors, wie sie bei der Apoptose aufgrund der Überexpression des Zellzyklus kontrollierenden p27^{Kip1} demonstriert wurde (259), um einen alternativen Apoptosesignalweg, dem ein anderer Mechanismus zur Aktivierung von TNF R1 zugrunde liegen könnte.

Die Stimulierung mit TNF α wurde in Kombination mit Cycloheximid (CHX) als Inhibitor von NF κ B durchgeführt. Damit sollte eine Blockade des antiapoptotischen NF κ B-Weges erreicht und die proapoptotische Wirkung von TNF-R1 gefördert werden. Passend zur Internalisierung des Rezeptors verstärkte SC-58635 die Apoptose, die mit ca. 80 % ein Apoptose-Maximum erreicht hatte (vgl. Abb. 22 u. 46), in HepG2-Zellen. In HuH-7-Zellen steigerte SC-58635 in Übereinstimmung zu der hoch signifikanten starken Internalisierung des TNF-R1-Rezeptors die Apoptose erheblich. Wie die Daten zeigen, könnte die hohe membranäre Expression von TNF-R1 in unbehandelten HuH-7-Zellen therapeutisch von Vorteil sein, wenn der Rezeptor über einen geeigneten Wirkstoff, wie z.B. über die Sensitivierung mit SC-58635, zur Apoptose angeregt wird.

4.3.4. Zusammenfassende Diskussion zur Aktivierung der Todesrezeptoren

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Regulation der untersuchten Rezeptorsysteme CD95, TNF R1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zusammen ergibt ein komplexes Bild der Apoptosevermittlung durch SC-58635 über den extrinsischen Signalweg (Abb. 53). Die Rezeptoren unterschieden sich zum Teil erheblich voneinander in der Kinetik ihrer Oberflächenexpression innerhalb einer Zelllinie, aber auch zelltypspezifisch, während den ersten 2 bis 24 Stunden selektiver COX-2-Blockade. Dabei wäre die rasche Regulierung der Todesrezeptorexpression an der Zellmembran innerhalb ein bis zwei Stunden eher auf eine Bereitstellung der Rezeptoren aus den Golgi-Vesikeln zurückzuführen als auf eine transkriptionelle Regulation. Insgesamt scheint sich ein konzertiertes Zusammenspiel der Rezeptoren in der Apoptosevermittlung durch SC-58635 abzuzeichnen. Ein Beispiel hierfür wäre in HepG2-Zellen die schnelle transiente Hochregulierung von CD95, welche von der vorübergehenden Abnahme von TRAIL-R2 begleitet wurde. Der kontinuierlichen geringen Abnahme von TNF R1 und TRAIL-R1 kommt dagegen möglicherweise eher eine untergeordnete Bedeutung zu. Eventuell gibt es auch Kompensationsmechanismen für ausgefallene, funktionslose Rezeptoren. So könnte z.B. der Ausfall von CD95 in HuH-7-Zellen durch die transiente rasche Zunahme von TRAIL-R2 und der deutlichen starken Abnahme von TNF R1 kompensiert worden sein. Weitere Analysen einer möglichen Beeinflussung der Rezeptorsysteme untereinander könnten wichtige Hinweise auf neue Therapieoptionen geben. Gerade therapieresistente Karzinome, wie das HCC, könnten so mit einer gezielten Kombination aus SC-58635 und entsprechenden Antagonisten bzw. Agonisten der Rezeptorsysteme behandelt werden.

Kern et al. (195) demonstrierten ebenfalls eine umfassende Kinetik der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Todesrezeptoren in HuH-7- und HepG2-Zellen über 72 Stunden mit 10 μM SC-58635. In dieser über 72 Stunden bezüglich der *in vitro*-Apoptoseinduktion zu geringen Konzentration (vergl. Abb. 22 u. 23) war dennoch die Änderung des Rezeptorstatus an der Zelloberfläche für die meisten Todesrezeptoren signifikant. Hierbei wurde die membranäre Expression von CD95 und TRAIL-R2 in HepG2- und HuH-7-Zellen ähnlich zur Kinetik mit 100 μM , wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, reguliert. Die Konzentrationsänderung von TNF R1 und TRAIL-R1 an der Zellmembran erfolgte jedoch mit deren Hochregulierung gegensätzlich zu den Daten der vorliegenden Arbeit. Eine

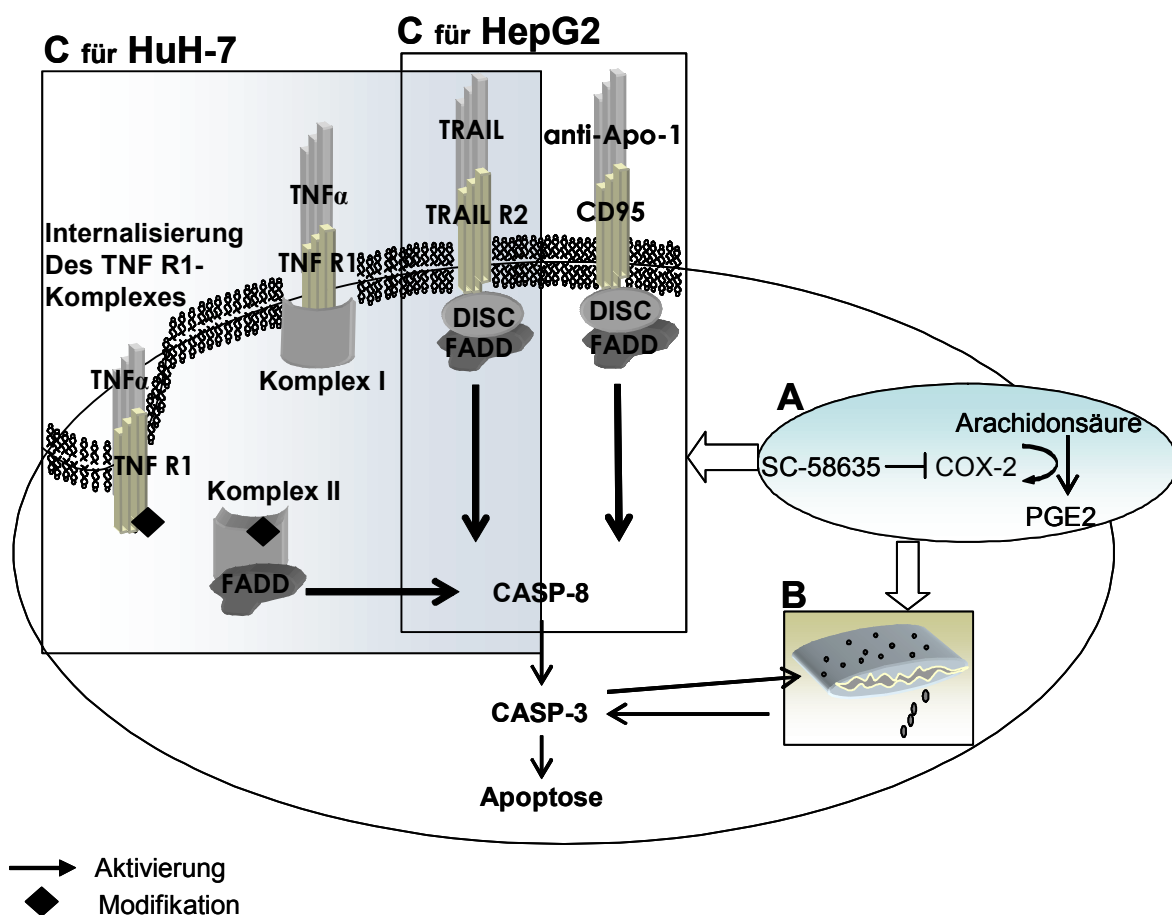


Abb. 53: Modellvorstellung. HepG2- und HuH-7-Zellen bevorzugen unterschiedliche Todesrezeptoren zur Apoptoseexekution nach selektiver COX-2-Inhibition durch SC-58635. **A:** Die selektive COX-2-Blockade beeinflusst den intrinsischen Apoptoseweg über die Mitochondrien und den extrinsischen Signalweg über die Todesrezeptoren. **B:** Aktivierung der Mitochondrien. Beschreibung s. Abb. 52. **C:** HepG2-Zellen mit WTp53 bevorzugen während der Apoptoseexekution das CD95-Rezeptor-System, begleitend von der transienten Herunterregulierung und anschließenden Stabilisierung von TRAIL-R2. In unbehandelten HuH-7-Zellen mit mutiertem p53 ist der TNF-R1-Status an der Zelloberfläche sehr hoch. Nach selektiver COX-2-Blockade kompensieren die Zellen ihr defektes CD95-System über die Internalisierung von TNF R1. Der für die Apoptose wichtige Komplex II wird nach der Modifikation (schwarze Raute) und der Trennung des Komplex I gebildet. Zusätzlich wird an der Zelloberfläche TRAIL-R2 transient hochreguliert. An den DISC-Komplex und Komplex II bindet FADD gemeinsam mit ProCASP-8. Somit stellt FADD ein zentrales Adapterprotein im extrinsischen Signalweg dar. CASP-8 wird in der Folge autoproteolytisch aktiviert, wodurch wiederum CASP-3 gespalten wird.

Hochregulierung von TNF-R1 und TRAIL-R1 würde, gemäß den diskutierten Ergebnissen, auf proliferative Effekte hindeuten, da für den proliferativen Signalweg über TNF und NF κ B der Rezeptor nicht, wie im apoptotischen Signalweg, internalisiert wird (172, 260). Außerdem wurde TRAIL-R1 bei Apoptoseinduktion mit SC-58635, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, herunterreguliert und könnte möglicherweise sogar proinflammatorisch wirken, wie dies in HaCaT-Keratinocyten demonstriert wurde (258) Andererseits deutet die Regulation von CD95 – nur in HepG2-Zellen – und TRAIL-R2 analog zur Behandlung mit 100 μ M SC-58635 auf apoptotische Mechanismen hin. Damit wären in der Langzeitbehandlung mit 10 μ M SC-58635, bezogen auf die Diskussion zur Rezeptorexpression bei 100 μ M, zwei unterschiedliche Prozesse, Proliferation und Apoptose, in der Zellkultur sichtbar. Möglicherweise sterben durch 10 μ M SC-58635 gerade so viele Zellen ab, dass die Zellkultur dadurch immer am oberen Ende der logarithmischen Phase bleibt und sich die übrigen Zellen besser teilen können. Damit wäre die Kultur in einer Art Gleichgewicht aus absterbenden und nachwachsenden Zellen, was sich in der Kinetik der Rezeptoren widerspiegeln würde.

4.4. Therapeutische Relevanz der SC-58635 induzierten selektiven COX-2-Blockade im HCC

In der vorliegenden Arbeit wurden als die der selektiven COX-2-Blockade zugrunde liegenden proapoptotischen molekularen Mechanismen die Aktivierung von Caspasen, sowie die Beteiligung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalweges in Hepatomzellen identifiziert.

Die Regulierung der Todesrezeptorsysteme im extrinsischen Signalweg, wie sie in der Arbeit *in vitro* nach SC-58635-Behandlung gezeigt wurde, impliziert eine autokrine Signalvermittlung. Dies würde die zelleigene Expression der Liganden und ihre funktionelle Bereitstellung voraussetzen, wie es in Hepatomzellen für den CD95-Liganden gezeigt wurde (160, 262). Unter therapeutischen Gesichtspunkten wäre für eine effektive Apoptose *in vivo* die Weiterleitung der Signale autokrin und nicht parakrin, wie z.B. gegen Zellen des Immunsystems gerichtet, wünschenswert. In weiterführenden Arbeiten müsste dafür *in vivo* eine Aktivierung der Rezeptorsysteme von Tumorzellen mit folgender parakriner Signalvermittlung ausgeschlossen werden. Die von den Tumorzellen exprimierten Liganden sollten dabei gegen die Tumorzellen selbst und nicht etwa gegen Immunzellen gerichtet werden, wie dies in anderen Arbeiten berichtet wurde (157, 158).

Bis auf den Ausfall des CD95-Rezeptorsystems in HuH-7-Zellen und der möglicherweise damit verbundenen unterschiedlichen Regulierung von TRAIL-R2 konnten keine wesentlichen Unterschiede in der SC-58635 induzierten Apoptose und ihrer Mechanismen in HepG2-Zellen mit Wtp53 und HuH-7-Zellen mit mutiertem p53 detektiert werden. Dementsprechend könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Unabhängigkeit der SC-58635 induzierten Apoptose von Wtp53 bzw. mutiertem p53 sein. Damit würde die selektive COX-2-Blockade einen enormen Vorteil gegenüber der therapeutischen Wirkung von Zytostatika darstellen, welche zumeist von Wtp53, das gerade in Karzinomen häufig mutiert vorliegt, abhängig ist (159, 160, 162, 189, 191).

Da, wie die Daten belegten, die SC-58635 induzierte Apoptoseexekution vom antiapoptotischen MCL-1 abhängig war, ist der in dieser Arbeit gezeigte rasche MCL-1-Abbau nach selektiver COX-2-Blockade von hoher klinischer Relevanz. So liegt ein Grund für die Therapieresistenz verschiedenster Tumorentitäten in der Akkumulation von MCL-1, was in der chronischen lymphatischen Leukämie (263), im Cholangiokarzinom (264) und insbesondere im HCC (116, 196, 229, 265-267) demonstriert wurde. Eine Überexpression von COX-2 bzw. die Zuführung von externem PGE₂ konnte die Apoptoseschwelle in humanen Lungenadenokarzinom-Zellen über die Hochregulierung des mcl-1-Gens erhöhen. Die daraus resultierende Anreicherung von MCL-1 wurde über den PI3K/Akt-abhängigen Signalweg weiter begünstigt (199). Dagegen konnten Fleischer et al. über die Reduktion von MCL-1 mit einem spezifischen PI3K-Inhibitor in Hepatomzellen eine Sensitivierung gegenüber Zytostatika bewirken (116).

Ob die SC-58635 induzierte Apoptose, mit ihren potentiellen Vorteilen, Defizite von Zytostatika in Hepatomzellen ausgleichen könnte, wurde abschließend in einer Kombinationsbehandlung von SC-58635 mit Bleomycin, Doxorubicin oder Mitoxantron überprüft. Dabei fiel zuerst die bessere apoptotische Wirkung von SC-58635 gegenüber der höchsten ausgewählten Konzentration der Chemotherapeutika auf. Die Kombination von Zytostatika mit SC-58635 ergab in allen Fällen eine Erhöhung der Chemosensitivität der Hepatomzellen, wobei auch hier der Unterschied zwischen Wtp53 und mutiertem p53 nicht wesentlich war. Ergänzend konnte mit der Reduktion der Apoptose mittels Ad fadd Δ^- die Beteiligung des extrinsischen Weges gezeigt werden. Von besonderer klinischer Relevanz war schließlich das Ergebnis der Kombinationsbehandlung von SC-58635 mit den ausgewählten Zytostatika in PHHs. SC-58635 konnte normale Leberzellen im Gegensatz zu Hepatomzellen nicht gegen die chemotherapeutisch induzierte Apoptose sensitivieren. In einer anderen Arbeit konnten die Autoren mit dem spezifischen COX-2-Inhibitor NS398 in

fötalen Prostata-Fibroblasten ebenfalls keine apoptotischen Charakteristika identifizieren (70). Ergänzende Versuche in Leber-Schnittkulturen bestätigten die Wirkungslosigkeit der spezifischen COX-2-Inhibition mit Meloxicam in nicht tumorösem Gewebe (268).

Aber auch aus der in der vorliegenden Arbeit gezeigten SC-58635 induzierten Sensitivierung der Todesrezeptorsysteme für ihre entsprechenden Liganden ließe sich ein therapeutischer Nutzen der Kombinationsbehandlung von Liganden mit SC-58635 ableiten. Hierzu gibt es beispielsweise Untersuchungen zur Verwendung von TRAIL als Antikrebs-Biotherapeutikum (253, 269). Auch eine therapeutische Anwendung von CD95-Ligand wird derzeit untersucht und diskutiert (270).

Die Ergebnisse zusammen geben vielversprechende Hinweise auf die klinische Relevanz der SC-58635 induzierten Apoptose über selektive COX-2-Blockade, insbesondere auf synergistische Behandlungsoptionen, wie beispielsweise die Kombination von SC-58635 mit herkömmlichen Zytostatika. In weiterführenden Studien könnten so effektive Therapiemöglichkeiten für das HCC mit SC-58635, stellvertretend für die Wirkstoffgruppe der NSARs, herausgearbeitet werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der Apoptoseexekution durch selektive COX-2-Blockade mit dem NSAR SC-58635 in den HCC-Zelllinien HepG2 und HuH-7 untersucht. Während der Apoptoseexekution wurde die frühzeitige Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und der Effektor-Caspasen CASP-3 und CASP-9 demonstriert und funktionell bestätigt. Weiter ergab die selektive COX-2-Blockade eine rasche Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges. SC-58635 führte in den Mitochondrien zu einer schnellen Herunterregulierung von MCL-1, ein antiapoptotisches BCL-2-Familienmitglied, gefolgt von der Translokation von BAX und BID an die Mitochondrien und der CYT-C-Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Diese Vorgänge waren mit der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials verbunden. In der Konsequenz führte die Überexpression von MCL-1 zu einer deutlichen Abnahme und die Blockade von endogenem MCL-1, mittels siRNA-mcl-1, zu einer Verstärkung der SC-58635 induzierten Apoptose.

Die Beteiligung des extrinsischen Signalweges wurde zunächst über die Reduktion der Apoptose nach Überexpression von FADD Δ , einer mutanten Form des FADD-Proteins, demonstriert. Zudem wurde durch die selektive COX-2-Blockade die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2 reguliert und die Rezeptorsysteme für ihre entsprechenden Liganden sensitiviert. Eine Ausnahme hiervon bildete das CD95-Rezeptorsystem von HuH-7-Zellen mit mutiertem p53.

Weiterhin beeinflussten FADD, CASP-8 und CASP-3 auch die Depolarisierung der Mitochondrienmembran, womit ein Einfluss des extrinsischen Signalweges auf den intrinsischen Signalweg deutlich wurde.

Von therapeutischer Relevanz war der Synergieeffekt von SC-58635 mit den chemotherapeutischen Wirkstoffen Bleomycin und Doxorubicin bei der Apoptoseinduktion sowie die Verstärkung der Apoptose in Kombination mit Mitoxantron in den untersuchten Zelllinien. Da dies unabhängig davon, ob p53 als WT oder in der mutierten Form vorlag, geschah, stellt die Kombination mit SC-58635 einen Vorteil gegenüber der klassischen chemotherapeutischen Behandlung, welche zumeist auf WTp53 angewiesen ist, dar. Weiterhin sensitivierte SC-58635 PHHs nicht für die chemotherapeutisch induzierte Apoptose, was die klinische Relevanz dieser Ergebnisse bestätigt.

6. Abstract

In the present work the mechanisms by which Cyclooxygenase (COX)-2 inhibition through the NSAR SC-58635 induces apoptosis were investigated in the hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines HepG2 containing WTp53 and HuH-7 possessing a mutated transcriptional inactive form of p53. The early activation of the initiator-caspase CASP-8 and the effector-caspases CASP-3 and CASP-9 during the apoptosis execution was demonstrated and functionally confirmed.

The findings showed a link between selective COX-2 inhibition and the mitochondrial apoptosis pathway. SC-58635 led to a rapid down-regulation of myeloid cell leukaemia-1 (MCL-1), an anti-apoptotic member of the BCL-2 family, followed by translocation of BAX and BID to mitochondria, CYT-C release from mitochondria and depolarisation of the mitochondrial membrane potential. Consequently, overexpression of MCL-1 led to the inhibition of SC-58635 mediated apoptosis. In addition, blocking endogenous MCL-1 function using a small-interfering (si) RNA approach enhanced COX-2 inhibitor-mediated apoptosis.

Furthermore, overexpression of a dominant negative FAS associated death domain mutant (FADD Δ) reduced COX-2 inhibitor-mediated apoptosis, which demonstrated the participation of the extrinsic pathway. Additionally, SC-58635 triggered cell surface expression of the CD95, TNF R and TRAIL-R1 and -R2 death receptors rapidly and sensitized the investigated receptorsystems for their specific ligands. An exception of this was the CD95 receptor in HuH-7 cells with mutated p53.

Additionally, FADD Δ as well as the inhibitors of CASP-8 and CASP-3 also reduced the depolarisation of the mitochondrial membranes. In order to that the extrinsic pathway via the death receptors showed an influence on the mitochondrial intrinsic pathway.

It is of clinical importance that SC-58635 acted synergistically with the chemotherapeutic drugs bleomycin and doxorubicin in the induction of apoptosis and it amplified apoptosis in combination with mitoxantrone. This was independent of the WT or mutated form of p53 in the investigated HCC cell lines, which is an advantage over the dependency of WTp53 during classical chemotherapeutic treatment. The clinical relevance of these results is further substantiated by the finding that SC-58635 did not sensitize primary hepatocytes (PHH) toward chemotherapy-induced apoptosis.

7. Literaturverzeichnis

1. Di Bisceglie, A. M. Epidemiology and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol*, 13: S169-171, 2002.
2. Bruix, J., Boix, L., Sala, M., and Llovet, J. M. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 5: 215-219, 2004.
3. Llovet, J. M., Burroughs, A., and Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362: 1907-1917, 2003.
4. Kern, M. A., Breuhahn, K., and Schirmacher, P. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Adv Cancer Res*, 86: 67-112, 2002.
5. Lu, Y. S., Hsu, C., Li, C. C., Kuo, S. H., Yeh, K. H., Yang, C. H., Hsu, C. H., Wu, C. Y., and Cheng, A. L. Phase II study of combination doxorubicin, interferon-alpha, and high-dose tamoxifen treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 51: 815-819, 2004.
6. Schwartz, J. D. and Beutler, A. S. Therapy for unresectable hepatocellular carcinoma: review of the randomized clinical trials-II: systemic and local non-embolization-based therapies in unresectable and advanced hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs*, 15: 439-452, 2004.
7. El-Serag, H. B. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*, 127: S27-34, 2004.
8. Bosch, F. X., Ribes, J., Cleries, R., and Diaz, M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 9: 191-211, v, 2005.
9. El-Serag, H. B. and Mason, A. C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 340: 745-750, 1999.
10. Di Bisceglie, A. M. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 26: 34S-38S, 1997.
11. Morgan, T. R., Mandayam, S., and Jamal, M. M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127: S87-96, 2004.
12. O'Neill, G. P. and Ford-Hutchinson, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*, 330: 156-160, 1993.
13. Fosslien, E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 37: 431-502., 2000.
14. Takeuchi, K., Araki, H., Umeda, M., Komoike, Y., and Suzuki, K. Adaptive gastric cytoprotection is mediated by prostaglandin EP1 receptors: a study using rats and knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 297: 1160-1165, 2001.
15. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., and Lipsky, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 12: 1063-1073, 1998.
16. Smith, W. L., Garavito, R. M., and DeWitt, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 271: 33157-33160, 1996.
17. Rowley, A. F., Vogan, C. L., Taylor, G. W., and Clare, A. S. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J Exp Biol*, 208: 3-14, 2005.
18. Vogel, C. Prostaglandin H synthases and their importance in chemical toxicity. *Curr Drug Metab*, 1: 391-404, 2000.
19. Marks, F. and Furstenberger, G. Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. *Eur J Cancer*, 36: 314-329, 2000.
20. Sharma, R. A., Gescher, A., Plataras, J. P., Leuratti, C., Singh, R., Gallacher-Horley, B., Offord, E., Marnett, L. J., Steward, W. P., and Plummer, S. M. Cyclooxygenase-2,

- malondialdehyde and pyrimidopurinone adducts of deoxyguanosine in human colon cells. *Carcinogenesis*, 22: 1557-1560, 2001.
21. Dey, I., Lejeune, M., and Chadee, K. Prostaglandin E(2) receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol*, 149: 611-623, 2006.
 22. Fosslien, E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*, 30: 3-21., 2000.
 23. Di Popolo, A., Memoli, A., Apicella, A., Tuccillo, C., di Palma, A., Ricchi, P., Acquaviva, A. M., and Zarrilli, R. IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 19: 5517-5524, 2000.
 24. Schirmacher, P., Held, W. A., Yang, D., Chisari, F. V., Rustum, Y., and Rogler, C. E. Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res*, 52: 2549-2556, 1992.
 25. Li, X., Nong, Z., Ekstrom, C., Larsson, E., Nordlinder, H., Hofmann, W. J., Trautwein, C., Odenthal, M., Dienes, H. P., Ekstrom, T. J., and Schirmacher, P. Disrupted IGF2 promoter control by silencing of promoter P1 in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 57: 2048-2054, 1997.
 26. Ng, I. O., Lee, J. M., Srivastava, G., and Ng, M. Expression of insulin-like growth factor II mRNA in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 13: 152-157, 1998.
 27. Konig, J. E., Senge, T., Allhoff, E. P., and Konig, W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Prostate*, 58: 121-129, 2004.
 28. Billich, A., Bornancin, F., Mechtcheriakova, D., Natt, F., Huesken, D., and Baumruker, T. Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function in cell survival and IL-1beta and TNF-alpha induced production of inflammatory mediators. *Cell Signal*, 17: 1203-1217, 2005.
 29. Tietze, M. K., Wuestefeld, T., Paul, Y., Zender, L., Trautwein, C., Manns, M. P., and Kubicka, S. IkappaBalpha gene therapy in tumor necrosis factor-alpha- and chemotherapy-mediated apoptosis of hepatocellular carcinomas. *Cancer Gene Ther*, 7: 1315-1323, 2000.
 30. Plumpe, J., Malek, N. P., Bock, C. T., Rakemann, T., Manns, M. P., and Trautwein, C. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278: G173-183, 2000.
 31. Liedtke, C., Plumpe, J., Kubicka, S., Bradham, C. A., Manns, M. P., Brenner, D. A., and Trautwein, C. Jun kinase modulates tumor necrosis factor-dependent apoptosis in liver cells. *Hepatology*, 36: 315-325, 2002.
 32. Konson, A., Mahajna, J. A., Danon, A., Rimon, G., and Agbaria, R. The involvement of nuclear factor-kappa B in cyclooxygenase-2 overexpression in murine colon cancer cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Gene Ther*, 13: 1093-1104, 2006.
 33. Chun, K. S. and Surh, Y. J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol*, 68: 1089-1100, 2004.
 34. Zhang, G. S., Liu, D. S., Dai, C. W., and Li, R. J. Antitumor effects of celecoxib on K562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of Cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib. *Am J Hematol*, 81: 242-255, 2006.
 35. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93: 705-716, 1998.

36. Sweeney, C. J., Marshall, M. S., Barnard, D. S., Heilman, D. K., Billings, S. D., Cheng, L., Marshall, S. J., and Yip-Schneider, M. T. Cyclo-oxygenase-2 expression in primary cancers of the lung and bladder compared to normal adjacent tissue. *Cancer Detect Prev*, 26: 238-244, 2002.
37. Komhoff, M., Guan, Y., Shappell, H. W., Davis, L., Jack, G., Shyr, Y., Koch, M. O., Shappell, S. B., and Breyer, M. D. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas. *Am J Pathol*, 157: 29-35, 2000.
38. Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J., and Koki, A. T. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 89: 2637-2645, 2000.
39. Richardson, C. M., Sharma, R. A., Cox, G., and O'Byrne, K. J. Epidermal growth factor receptors and cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of non-small cell lung cancer: potential targets for chemoprevention and systemic therapy. *Lung Cancer*, 39: 1-13, 2003.
40. Bae, S. H., Jung, E. S., Park, Y. M., Kim, B. S., Kim, B. K., Kim, D. G., and Ryu, W. S. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res*, 7: 1410-1418., 2001.
41. Koga, H., Sakisaka, S., Ohishi, M., Kawaguchi, T., Taniguchi, E., Sasatomi, K., Harada, M., Kusaba, T., Tanaka, M., Kimura, R., Nakashima, Y., Nakashima, O., Kojiro, M., Kurohiji, T., and Sata, M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology*, 29: 688-696., 1999.
42. Kondo, M., Yamamoto, H., Nagano, H., Okami, J., Ito, Y., Shimizu, J., Eguchi, H., Miyamoto, A., Dono, K., Umeshita, K., Matsuura, N., Wakasa, K., Nakamori, S., Sakon, M., and Monden, M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 5: 4005-4012., 1999.
43. Leng, J., Han, C., Demetris, A. J., Michalopoulos, G. K., and Wu, T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology*, 38: 756-768, 2003.
44. Cervello, M., Foderaa, D., Florena, A. M., Soresi, M., Tripodo, C., D'Alessandro, N., and Montalto, G. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of inflammatory cells in human primary hepatocellular carcinoma: possible role in tumor promotion and angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 11: 4638-4643, 2005.
45. Kern, M. A., Schubert, D., Sahi, D., Schoneweiss, M. M., Moll, I., Haugg, A. M., Dienes, H. P., Breuhahn, K., and Schirmacher, P. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology*, 36: 885-894, 2002.
46. Morinaga, S., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Imada, T., Rino, Y., Akaike, M., Sugimasa, Y., Takemiya, S., Kameda, Y., and Takanashi, Y. Cyclooxygenase-2 mRNA is up-regulated in cirrhotic or chronic hepatitis liver adjacent to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 17: 1110-1116., 2002.
47. Niketeghad, F., Decker, H. J., Caselmann, W. H., Lund, P., Geissler, F., Dienes, H. P., and Schirmacher, P. Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis. *Br J Cancer*, 85: 697-704, 2001.
48. Zondervan, P. E., Wink, J., Alers, J. C., JN, I. J., Schalm, S. W., de Man, R. A., and van Dekken, H. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol*, 192: 207-215, 2000.

49. Moinzadeh, P., Breuhahn, K., Stutzer, H., and Schirmacher, P. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis. *Br J Cancer*, *92*: 935-941, 2005.
50. Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., Takahashi, E., and Tanabe, T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem*, *221*: 889-897, 1994.
51. Tay, A., Simon, J. S., Squire, J., Hamel, K., Jacob, H. J., and Skorecki, K. Cytosolic phospholipase A2 gene in human and rat: chromosomal localization and polymorphic markers. *Genomics*, *26*: 138-141, 1995.
52. Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W. J., Mestre, J. R., Sampat, A., and Dannenberg, A. J. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem*, *274*: 10911-10915, 1999.
53. Lee, D. W., Park, S. W., Park, S. Y., Heo, D. S., Kim, K. H., and Sung, M. W. Effects of p53 or p27 overexpression on cyclooxygenase-2 gene expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck*, *26*: 706-715, 2004.
54. Liu, X. H., Kirschenbaum, A., Yu, K., Yao, S., and Levine, A. C. Cyclooxygenase-2 suppresses hypoxia-induced apoptosis via a combination of direct and indirect inhibition of p53 activity in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem*, *280*: 3817-3823, 2005.
55. Bressac, B., Galvin, K. M., Liang, T. J., Isselbacher, K. J., Wands, J. R., and Ozturk, M. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*: 1973-1977, 1990.
56. Staib, F., Hussain, S. P., Hofseth, L. J., Wang, X. W., and Harris, C. C. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat*, *21*: 201-216, 2003.
57. Smith, M. L., Hawcroft, G., and Hull, M. A. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer*, *36*: 664-674, 2000.
58. Watson, A. J. Chemopreventive effects of NSAIDs against colorectal cancer: regulation of apoptosis and mitosis by COX-1 and COX-2. *Histol Histopathol*, *13*: 591-597, 1998.
59. Tsujii, M. and DuBois, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, *83*: 493-501, 1995.
60. Ziegler, J. Cancer and arthritis share underlying processes. *J Natl Cancer Inst*, *90*: 802-803, 1998.
61. Taketo, M. M. COX-2 and colon cancer. *Inflamm Res*, *47 Suppl 2*: S112-116, 1998.
62. Taketo, M. M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst*, *90*: 1529-1536, 1998.
63. Rahman, M. A., Dhar, D. K., Masunaga, R., Yamanoi, A., Kohno, H., and Nagasue, N. Sulindac and exisulind exhibit a significant antiproliferative effect and induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res*, *60*: 2085-2089, 2000.
64. Goldberg, Y., Nassif, II, Pittas, A., Tsai, L. L., Dynlacht, B. D., Rigas, B., and Shiff, S. J. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene*, *12*: 893-901, 1996.
65. Molina, M. A., Sitja-Arnau, M., Lemoine, M. G., Frazier, M. L., and Sinicrope, F. A. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res*, *59*: 4356-4362, 1999.

66. Thompson, H. J., Jiang, C., Lu, J., Mehta, R. G., Piazza, G. A., Paranka, N. S., Pamukcu, R., and Ahnen, D. J. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, 57: 267-271, 1997.
67. Kern, M. A., Schoneweiss, M. M., Sahi, D., Bahlo, M., Haugg, A. M., Kasper, H. U., Dienes, H. P., Kaferstein, H., Breuhahn, K., and Schirmacher, P. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of human hepatocellular carcinoma implants in nude mice. *Carcinogenesis*, 25: 1193-1199, 2004.
68. Goldstein, J. L., Correa, P., Zhao, W. W., Burr, A. M., Hubbard, R. C., Verburg, K. M., and Geis, G. S. Reduced incidence of gastroduodenal ulcers with celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor, compared to naproxen in patients with arthritis. *Am J Gastroenterol*, 96: 1019-1027, 2001.
69. Sawaoka, H., Kawano, S., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E. S., Takei, Y., Nagano, K., and Hori, M. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol*, 274: G1061-1067, 1998.
70. Liu, X. H., Yao, S., Kirschenbaum, A., and Levine, A. C. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res*, 58: 4245-4249, 1998.
71. Hsu, A. L., Ching, T. T., Wang, D. S., Song, X., Rangnekar, V. M., and Chen, C. S. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*, 275: 11397-11403, 2000.
72. Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., Zweifel, B. S., Settle, S. L., Woerner, B. M., Edwards, D. A., Flickinger, A. G., Moore, R. J., and Seibert, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*, 60: 1306-1311, 2000.
73. Hara, A., Yoshimi, N., Niwa, M., Ino, N., and Mori, H. Apoptosis induced by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human colorectal cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res*, 88: 600-604, 1997.
74. Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S. C., Isakson, P., Coffey, R. J., Morrow, J., Beauchamp, R. D., and DuBois, R. N. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, 99: 2254-2259, 1997.
75. Erickson, B. A., Longo, W. E., Panesar, N., Mazuski, J. E., and Kaminski, D. L. The effect of selective cyclooxygenase inhibitors on intestinal epithelial cell mitogenesis. *J Surg Res*, 81: 101-107, 1999.
76. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
77. Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205-219, 2004.
78. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407: 789-795, 2000.
79. Roshal, M., Zhu, Y., and Planelles, V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, 6: 103-116, 2001.
80. Krammer, P. H. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*, 71: 163-210, 1999.
81. Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*, 57: 1835-1840, 1997.
82. Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, 142: 67-77, 1984.
83. Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. The protein structures that shape caspase

- activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384: 201-232, 2004.
84. Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., and Inohara, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17: 3237-3245., 1998.
 85. Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22: 299-306, 1997.
 86. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391: 96-99, 1998.
 87. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391: 43-50, 1998.
 88. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-490, 1998.
 89. Chen, M., Orozco, A., Spencer, D. M., and Wang, J. Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem*, 277: 50761-50767, 2002.
 90. Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C., and Grutter, M. G. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell*, 11: 543-549, 2003.
 91. Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*, 11: 529-541, 2003.
 92. Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E., and Yang, X. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J*, 22: 4132-4142, 2003.
 93. Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9: 423-432, 2002.
 94. Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274: 11549-11556, 1999.
 95. Cain, K., Bratton, S. B., and Cohen, G. M. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84: 203-214, 2002.
 96. Bossy-Wetzell, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J*, 17: 37-49, 1998.
 97. Newmeyer, D. D. and Ferguson-Miller, S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, 112: 481-490, 2003.
 98. Ernster, L. and Schatz, G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*, 91: 227s-255s, 1981.
 99. Frey, T. G. and Mannella, C. A. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25: 319-324, 2000.
 100. Newmeyer, D. D., Farschon, D. M., and Reed, J. C. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, 79: 353-364, 1994.
 101. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157., 1996.
 102. Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Potapovich, A. I., Kini, V., Amoscato, A. A., and Fujii, Y. Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radic Biol Med*, 37: 1963-1985, 2004.
 103. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., and Kroemer, G.

- Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, *13*: 1423-1433, 2006.
104. Zamzami, N. and Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*: 67-71, 2001.
 105. Green, D. R. and Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, *305*: 626-629, 2004.
 106. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, *281*: 2027-2031, 1998.
 107. Reed, J. C. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ*, *13*: 1378-1386, 2006.
 108. Letai, A., Bassik, M., Walensky, L., Sorcinelli, M., Weiler, S., and Korsmeyer, S. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, *2*: 183., 2002.
 109. Kuwana, T. and Newmeyer, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, *15*: 691-699, 2003.
 110. Huang, D. C. and Strasser, A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, *103*: 839-842, 2000.
 111. Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, *32*: 1123-1136, 2000.
 112. Yang, T., Kozopas, K. M., and Craig, R. W. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol*, *128*: 1173-1184, 1995.
 113. Akgul, C., Moulding, D. A., White, M. R., and Edwards, S. W. In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett*, *478*: 72-76, 2000.
 114. Craig, R. W. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia*, *16*: 444-454, 2002.
 115. Chao, J. R., Wang, J. M., Lee, S. F., Peng, H. W., Lin, Y. H., Chou, C. H., Li, J. C., Huang, H. M., Chou, C. K., Kuo, M. L., Yen, J. J., and Yang-Yen, H. F. mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol*, *18*: 4883-4898, 1998.
 116. Fleischer, B., Schulze-Bergkamen, H., Schuchmann, M., Weber, A., Biesterfeld, S., Muller, M., Krammer, P. H., and Galle, P. R. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, *28*: 25-32, 2006.
 117. Bingle, C. D., Craig, R. W., Swales, B. M., Singleton, V., Zhou, P., and Whyte, M. K. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J Biol Chem*, *275*: 22136-22146, 2000.
 118. Bae, J., Leo, C. P., Hsu, S. Y., and Hsueh, A. J. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem*, *275*: 25255-25261, 2000.
 119. Domina, A. M., Smith, J. H., and Craig, R. W. Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition. *J Biol Chem*, *275*: 21688-21694, 2000.
 120. Schubert, K. M. and Duronio, V. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochem J*, *356*: 473-480, 2001.

121. Zhou, P., Qian, L., Kozopas, K. M., and Craig, R. W. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood*, *89*: 630-643, 1997.
122. Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D., and White, E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev*, *17*: 2922-2932, 2003.
123. Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*, *17*: 1475-1486, 2003.
124. Yang, T., Buchan, H. L., Townsend, K. J., and Craig, R. W. MCL-1, a member of the BCL-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation. *J Cell Physiol*, *166*: 523-536, 1996.
125. Townsend, K. J., Trusty, J. L., Traupman, M. A., Eastman, A., and Craig, R. W. Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C. *Oncogene*, *17*: 1223-1234, 1998.
126. Zhan, Q., Bieszczad, C. K., Bae, I., Fornace, A. J., Jr., and Craig, R. W. Induction of BCL2 family member MCL1 as an early response to DNA damage. *Oncogene*, *14*: 1031-1039, 1997.
127. Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., and Huang, D. C. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, *19*: 1294-1305, 2005.
128. Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., and George, D. L. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*, *6*: 443-450, 2004.
129. Michels, J., Johnson, P. W., and Packham, G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol*, *37*: 267-271, 2005.
130. Snowden, R. T., Sun, X. M., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia*, *17*: 1981-1989, 2003.
131. Clohessy, J. G., Zhuang, J., and Brady, H. J. Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br J Haematol*, *125*: 655-665, 2004.
132. Herrant, M., Luciano, F., Loubat, A., and Auburger, P. The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation. *Oncogene*, *21*: 4957-4968, 2002.
133. Yamaguchi, H., Chen, J., Bhalla, K., and Wang, H. G. Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, *279*: 39431-39437, 2004.
134. Zhang, H. G., Wang, J., Yang, X., Hsu, H. C., and Mountz, J. D. Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene*, *23*: 2009-2015, 2004.
135. Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., and Youle, R. J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, *139*: 1281-1292, 1997.
136. Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, *144*: 891-901, 1999.
137. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, *20*: 929-935, 2000.
138. Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release

- of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, *399*: 483-487, 1999.
139. von Haefen, C., Wieder, T., Gillissen, B., Starck, L., Graupner, V., Dorken, B., and Daniel, P. T. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene*, *21*: 4009-4019, 2002.
 140. Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, *292*: 727-730, 2001.
 141. Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*, *15*: 1481-1486, 2001.
 142. Diaz, J. L., Oltersdorf, T., Horne, W., McConnell, M., Wilson, G., Weeks, S., Garcia, T., and Fritz, L. C. A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members. *J Biol Chem*, *272*: 11350-11355, 1997.
 143. Yin, X. M., Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, *369*: 321-323, 1994.
 144. Fischer, U., Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene*, *25*: 152-159, 2006.
 145. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, *94*: 491-501, 1998.
 146. Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J*, *368*: 915-921, 2002.
 147. Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, *7*: 1166-1173, 2000.
 148. Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, *111*: 331-342, 2002.
 149. Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., and Korsmeyer, S. J. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, *400*: 886-891, 1999.
 150. Peter, M. E. and Krammer, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, *10*: 26-35, 2003.
 151. Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., and Weissberg, P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, *282*: 290-293, 1998.
 152. Ivanov, V. N., Lopez Bergami, P., Maulit, G., Sato, T. A., Sassoon, D., and Ronai, Z. FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol*, *23*: 3623-3635, 2003.
 153. Zhang, X. D., Franco, A. V., Nguyen, T., Gray, C. P., and Hersey, P. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol*, *164*: 3961-3970, 2000.
 154. Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Rauch, C. T. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*, *16*: 5386-5397, 1997.

155. Jones, S. J., Ledgerwood, E. C., Prins, J. B., Galbraith, J., Johnson, D. R., Pober, J. S., and Bradley, J. R. TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol*, *162*: 1042-1048, 1999.
156. Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P. H. Death receptor signaling. *J Cell Sci*, *118*: 265-267, 2005.
157. O'Connell, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., and Shanahan, F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med*, *184*: 1075-1082, 1996.
158. Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., and Tschopp, J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, *274*: 1363-1366, 1996.
159. Friesen, C., Fulda, S., and Debatin, K. M. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia*, *13*: 1854-1858, 1999.
160. Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest*, *99*: 403-413, 1997.
161. Hug, H., Strand, S., Grambihler, A., Galle, J., Hack, V., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem*, *272*: 28191-28193, 1997.
162. Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., and Debatin, K. M. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res*, *57*: 3823-3829, 1997.
163. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, *14*: 5579-5588, 1995.
164. Siegel, R. M., Chan, F. K., Chun, H. J., and Lenardo, M. J. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*, *1*: 469-474, 2000.
165. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, *81*: 505-512, 1995.
166. Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K., and Peter, M. E. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*, *22*: 207-220, 2002.
167. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, *17*: 1675-1687, 1998.
168. Varfolomeev, E. E. and Ashkenazi, A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell*, *116*: 491-497, 2004.
169. Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, *441*: 431-436, 2006.
170. Chen, G. and Goeddel, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, *296*: 1634-1635, 2002.
171. Karin, M. and Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, *3*: 221-227, 2002.
172. Micheau, O. and Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two

- sequential signaling complexes. *Cell*, 114: 181-190, 2003.
173. Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y., and Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell*, 115: 61-70, 2003.
174. Wada, M., Bartram, C. R., Nakamura, H., Hachiya, M., Chen, D. L., Borenstein, J., Miller, C. W., Ludwig, L., Hansen-Hagge, T. E., Ludwig, W. D., and et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood*, 82: 3163-3169, 1993.
175. Bardeesy, N., Falkoff, D., Petruzzi, M. J., Nowak, N., Zabel, B., Adam, M., Aguiar, M. C., Grundy, P., Shows, T., and Pelletier, J. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet*, 7: 91-97, 1994.
176. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265: 346-355, 1994.
177. Jeffrey, P. D., Gorina, S., and Pavletich, N. P. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, 267: 1498-1502, 1995.
178. McLure, K. G. and Lee, P. W. How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J*, 17: 3342-3350, 1998.
179. Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 7: 1126-1132, 1993.
180. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307-310, 2000.
181. Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A. Y., Qin, J., and Gu, W. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, 416: 648-653, 2002.
182. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16, 1992.
183. Longley, D. B., Allen, W. L., McDermott, U., Wilson, T. R., Latif, T., Boyer, J., Lynch, M., and Johnston, P. G. The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clin Cancer Res*, 10: 3562-3571, 2004.
184. Takimoto, R. and El-Deiry, W. S. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*, 19: 1735-1743, 2000.
185. Rozenfeld-Granot, G., Krishnamurthy, J., Kannan, K., Toren, A., Amariglio, N., Givol, D., and Rechavi, G. A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. *Oncogene*, 21: 1469-1476, 2002.
186. Miyashita, T. and Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80: 293-299, 1995.
187. Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, 11: 577-590, 2003.
188. Erster, S., Mihara, M., Kim, R. H., Petrenko, O., and Moll, U. M. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol*, 24: 6728-6741, 2004.
189. Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P. H. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, 188: 2033-2045, 1998.
190. Fisher, D. E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, 78: 539-542, 1994.

191. Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., Martin, F., and Dimanche-Boitrel, M. T. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, *89*: 783-789, 1997.
192. Ganten, T. M., Haas, T. L., Sykora, J., Stahl, H., Sprick, M. R., Fas, S. C., Krueger, A., Weigand, M. A., Grosse-Wilde, A., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Walczak, H. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ*, *11 Suppl 1*: S86-96, 2004.
193. Nowak, A. K., Chow, P. K., and Findlay, M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. *Eur J Cancer*, *40*: 1474-1484, 2004.
194. Malka, D., Pacault, V., De Baere, T., Ducreux, M., and Boige, V. Antitumoral effect of celecoxib in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, *23*: 4805-4806, 2005.
195. Kern, M. A., Haugg, A. M., Koch, A. F., Schilling, T., Breuhahn, K., Walczak, H., Fleischer, B., Trautwein, C., Michalski, C., Schulze-Bergkamen, H., Friess, H., Stremmel, W., Krammer, P. H., Schirmacher, P., and Muller, M. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, *66*: 7059-7066, 2006.
196. Schulze-Bergkamen, H., Brenner, D., Krueger, A., Suess, D., Fas, S. C., Frey, C. R., Dax, A., Zink, D., Buchler, P., Muller, M., and Krammer, P. H. Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt. *Hepatology*, *39*: 645-654, 2004.
197. Sheng, G. G., Shao, J., Sheng, H., Hooton, E. B., Isakson, P. C., Morrow, J. D., Coffey, R. J., Jr., DuBois, R. N., and Beauchamp, R. D. A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, *113*: 1883-1891, 1997.
198. Gately, S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, *19*: 19-27, 2000.
199. Lin, M. T., Lee, R. C., Yang, P. C., Ho, F. M., and Kuo, M. L. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem*, *276*: 48997-49002, 2001.
200. Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, *282*: 615-616, 1979.
201. Nakabayashi, H., Taketa, K., Yamane, T., Miyazaki, M., Miyano, K., and Sato, J. Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gann*, *75*: 151-158, 1984.
202. Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C. C., and Montesano, R. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res*, *26*: 205-213, 1998.
203. Hsu, I. C., Tokiwa, T., Bennett, W., Metcalf, R. A., Welsh, J. A., Sun, T., and Harris, C. C. p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis*, *14*: 987-992, 1993.
204. Gallo, O., Schiavone, N., Papucci, L., Sardi, I., Magnelli, L., Franchi, A., Masini, E., and Capaccioli, S. Down-regulation of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 pathways by p53 in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*, *163*: 723-732, 2003.
205. Bradham, C. A., Qian, T., Streetz, K., Trautwein, C., Brenner, D. A., and Lemasters, J. J. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol*, *18*: 6353-6364, 1998.

206. Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 271: 4961-4965, 1996.
207. Stratford-Perricaudet, L. D., Makeh, I., Perricaudet, M., and Briand, P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest*, 90: 626-630, 1992.
208. Hosono, S., Lee, C. S., Chou, M. J., Yang, C. S., and Shih, C. H. Molecular analysis of the p53 alleles in primary hepatocellular carcinomas and cell lines. *Oncogene*, 6: 237-243, 1991.
209. Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., and Brenner, H. J. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*, 15: 659-670, 1979.
210. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36: 59-74, 1977.
211. Schulze-Bergkamen, H., Untergasser, A., Dax, A., Vogel, H., Buchler, P., Klar, E., Lehnert, T., Friess, H., Buchler, M. W., Kirschfink, M., Stremmel, W., Krammer, P. H., Muller, M., and Protzer, U. Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 38: 736-744, 2003.
212. Gressner, O., Schilling, T., Lorenz, K., Schulze Schleithoff, E., Koch, A., Schulze-Bergkamen, H., Maria Lena, A., Candi, E., Terrinoni, A., Valeria Catani, M., Oren, M., Melino, G., Krammer, P. H., Stremmel, W., and Muller, M. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J*, 24: 2458-2471, 2005.
213. Muller, M., Schilling, T., Sayan, A. E., Kairat, A., Lorenz, K., Schulze-Bergkamen, H., Oren, M., Koch, A., Tannapfel, A., Stremmel, W., Melino, G., and Krammer, P. H. TAp73/DeltaNp73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ*, 2005.
214. Sumitomo, M., Ohba, M., Asakuma, J., Asano, T., Kuroki, T., and Hayakawa, M. Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. *J Clin Invest*, 109: 827-836, 2002.
215. Ling, Y., Zhong, Y., and Perez-Soler, R. Disruption of cell adhesion and caspase-mediated proteolysis of beta- and gamma-catenins and APC protein in paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Pharmacol*, 59: 593-603., 2001.
216. Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., and Franceschi, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, 197: 40-45, 1993.
217. Caruso, J. A., Mathieu, P. A., Joiakim, A., Zhang, H., and Reiners, J. J., Jr. Aryl hydrocarbon receptor modulation of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and lysosomal disruption in a hepatoma model that is caspase-8-independent. *J Biol Chem*, 281: 10954-10967, 2006.
218. Polunovsky, V. A., Wendt, C. H., Ingbar, D. H., Peterson, M. S., and Bitterman, P. B. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res*, 214: 584-594, 1994.
219. Walczak, H., Bouchon, A., Stahl, H., and Krammer, P. H. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res*, 60: 3051-

- 3057, 2000.
220. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63, 1983.
221. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139: 271-279, 1991.
222. Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Jr., and Chen, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 3671-3675, 1991.
223. Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M. R., and Darzynkiewicz, Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, 35: 181-195, 1999.
224. Chou, T. C. and Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 22: 27-55, 1984.
225. Vivanco, I. and Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2: 489-501, 2002.
226. Breinig, M., Rieker, R., Eiteneuer, E., Wertenbruch, T., Haugg, A. M., Helmke, B. M., Schirmacher, P., and Kern, M. A. Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 122: 547-557, 2008.
227. Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85: 817-827, 1996.
228. Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., and Tang, H. Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *J Biol Chem*, 280: 10491-10500, 2005.
229. Sieghart, W., Losert, D., Strommer, S., Cejka, D., Schmid, K., Rasoul-Rockenschaub, S., Bodingbauer, M., Crevenna, R., Monia, B. P., Peck-Radosavljevic, M., and Wacheck, V. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol*, 44: 151-157, 2006.
230. El-Serag, H. B., Mason, A. C., and Key, C. Trends in survival of patients with hepatocellular carcinoma between 1977 and 1996 in the United States. *Hepatology*, 33: 62-65, 2001.
231. Castells, A., Bruix, J., Bru, C., Ayuso, C., Roca, M., Boix, L., Vilana, R., and Rodes, J. Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo-controlled trial in 120 patients. *Gastroenterology*, 109: 917-922, 1995.
232. Ikeda, M., Okusaka, T., Ueno, H., Takezako, Y., and Morizane, C. A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 103: 756-762, 2005.
233. Salvesen, G. S. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem*, 38: 9-19, 2002.
234. Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68: 383-424, 1999.
235. Grosch, S., Maier, T. J., Schiffmann, S., and Geisslinger, G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, 98: 736-747, 2006.
236. Arico, S., Pattingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P., and Ogier-Denis, E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem*, 277:

- 27613-27621, 2002.
237. Maier, T. J., Schilling, K., Schmidt, R., Geisslinger, G., and Grosch, S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, *67*: 1469-1478, 2004.
238. Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., and Taketo, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, *87*: 803-809, 1996.
239. Taketo, M. M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst*, *90*: 1609-1620, 1998.
240. Sheng, H., Shao, J., Morrow, J. D., Beauchamp, R. D., and DuBois, R. N. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*, *58*: 362-366, 1998.
241. Niederberger, E., Tegeder, I., Vetter, G., Schmidtko, A., Schmidt, H., Euchenhofer, C., Brautigam, L., Grosch, S., and Geisslinger, G. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J*, *15*: 1622-1624, 2001.
242. Perez-Galan, P., Marzo, I., Giraldo, P., Rubio-Felix, D., Lasierra, P., Larrad, L., Anel, A., and Naval, J. Role of caspases and apoptosis-inducing factor (AIF) in cladribine-induced apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *16*: 2106-2114, 2002.
243. Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Lopez-Royuela, N., Gomez-Benito, M., Larrad, L., Lasierra, P., Rubio-Felix, D., Anel, A., and Naval, J. Farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, *18*: 1599-1604, 2004.
244. Sales, K. J. and Jabbour, H. N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction*, *126*: 559-567, 2003.
245. Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S., and Majima, M. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med*, *197*: 221-232, 2003.
246. Ricci, J. E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G. A., Yadava, N., Scheffler, I. E., Ellisman, M. H., and Green, D. R. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, *117*: 773-786, 2004.
247. Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem*, *277*: 14040-14047., 2002.
248. Valentijn, A. J. and Gilmore, A. P. Translocation of full-length Bid to mitochondria during anoikis. *J Biol Chem*, *279*: 32848-32857, 2004.
249. Tafani, M., Karpnich, N. O., Hurster, K. A., Pastorino, J. G., Schneider, T., Russo, M. A., and Farber, J. L. Cytochrome c release upon Fas receptor activation depends on translocation of full-length bid and the induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, *277*: 10073-10082, 2002.
250. Konig, H. G., Rehm, M., Gudorf, D., Krajewski, S., Gross, A., Ward, M. W., and Prehn, J. H. Full length Bid is sufficient to induce apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *BMC Cell Biol*, *8*: 7, 2007.
251. Jendrossek, V., Handrick, R., and Belka, C. Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J*, *17*: 1547-1549, 2003.
252. Liu, X., Yue, P., Zhou, Z., Khuri, F. R., and Sun, S. Y. Death receptor regulation and celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, *96*: 1769-

- 1780, 2004.
253. Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., and Lynch, D. H. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 5: 157-163, 1999.
 254. Wang, S. and El-Deiry, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, 22: 8628-8633, 2003.
 255. Yamanaka, T., Shiraki, K., Sugimoto, K., Ito, T., Fujikawa, K., Ito, M., Takase, K., Moriyama, M., Nakano, T., and Suzuki, A. Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology*, 32: 482-490, 2000.
 256. Kim, Y. S., Schwabe, R. F., Qian, T., Lemasters, J. J., and Brenner, D. A. TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappaB inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells. *Hepatology*, 36: 1498-1508, 2002.
 257. Griffith, T. S., Rauch, C. T., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Lynch, D. H., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Kubin, M. Z. Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J Immunol*, 162: 2597-2605, 1999.
 258. Leverkus, M., Sprick, M. R., Wachter, T., Denk, A., Brocker, E. B., Walczak, H., and Neumann, M. TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2. *J Invest Dermatol*, 121: 149-155, 2003.
 259. Jaruga-Killeen, E. and Rayford, W. TNF receptor 1 is involved in the induction of apoptosis by the cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1 in the prostate cancer cell line PC-3. *FASEB J*, 19: 139-141, 2005.
 260. Schutze, S., Machleidt, T., Adam, D., Schwandner, R., Wiegmann, K., Kruse, M. L., Heinrich, M., Wickel, M., and Kronke, M. Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J Biol Chem*, 274: 10203-10212, 1999.
 261. Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., and Schutze, S. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity*, 21: 415-428, 2004.
 262. Guy, C. S., Wang, J., and Michalak, T. I. Hepatocytes as cytotoxic effector cells can induce cell death by CD95 ligand-mediated pathway. *Hepatology*, 43: 1231-1240, 2006.
 263. Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J. M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H. G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C. M., Rai, K., Hines, J., and Reed, J. C. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*, 91: 3379-3389, 1998.
 264. Taniai, M., Grambihler, A., Higuchi, H., Werneburg, N., Bronk, S. F., Farrugia, D. J., Kaufmann, S. H., and Gores, G. J. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res*, 64: 3517-3524, 2004.
 265. Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., and Korsmeyer, S. J. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 426: 671-676, 2003.
 266. Opferman, J. T., Iwasaki, H., Ong, C. C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S. J. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*, 307: 1101-1104, 2005.
 267. Yu, C., Bruzek, L. M., Meng, X. W., Gores, G. J., Carter, C. A., Kaufmann, S. H., and

-
- Adjei, A. A. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene*, 24: 6861-6869, 2005.
268. Kern, M. A., Haugg, A. M., Eiteneuer, E., Konze, E., Drebber, U., Dienes, H. P., Breuhahn, K., Schirmacher, P., and Kasper, H. U. Ex vivo analysis of antineoplastic agents in precision-cut tissue slices of human origin: effects of cyclooxygenase-2 inhibition in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 26: 604-612, 2006.
269. Koschny, R., Walczak, H., and Ganten, T. M. The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med*, 85: 923-935, 2007.
270. Linkermann, A., Qian, J., Lettau, M., Kabelitz, D., and Janssen, O. Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 9: 119-134, 2005.

8. Teilpublikationen

Originalarbeiten

Breinig M, Rieker R, Eiteneuer E, Wertenbruch T, **Haugg AM**, Helmke BM, Schirmacher P, Kern MA, *Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer. 2007 Oct 4

Kern MA*, **Haugg AM***, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, Fleischer B, Trautwein C, Michalski C, Schulze-Bergkamen H, Friess H, Stremmel W, Krammer PH, Schirmacher P, Müller M, *Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res. 2006 Jul 15;66(14):7059-66. *shared first author

Kern MA, **Haugg AM**, Eiteneuer E, Konze E, Drebber U, Dienes HP, Breuhahn K, Schirmacher P, Kasper HU, *Ex vivo analysis of antineoplastic agents in precision-cut tissue slices of human origin: effects of cyclooxygenase-2 inhibition in hepatocellular carcinoma*. Liver Int. 2006 Jun;26(5):604-12.

Kern MA, Schoneweiss MM, Sahi D, Bahlo M, **Haugg AM**, Kasper HU, Dienes HP, Kaferstein H, Breuhahn K, Schirmacher P., *Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of human hepatocellular carcinoma implants in nude mice*. Carcinogenesis. 2004 Jul25(7):1193-1199.

Kern MA, Schubert D, Sahi D, Schoneweiss MM, Moll I, **Haugg AM**, Dienes HP, Breuhahn K, Schirmacher P., *Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells*. Hepatology. 2002 Oct. 36(4 Pt 1):885-94.

Ausgewählte Kongressbeiträge

Haugg AM, Müller M, Koch A, Breuhahn K, Schirmacher P, Kern MA; Celecoxib induziert todesrezeptor- und mitochondrienabhängig Apoptose in humanen HCC-Zelllinien – eine zentrale Rolle für MCL-1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin, 2006.

Haugg AM, Koch A, Lorenz K, Hill P, Schirmacher P, Müller M, Kern MA, *Celecoxib induces early mitochondria and caspases-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines*. 6th Congress of the European Hepato-Pancreato-Biliary Association, Heidelberg, 2005

Haugg AM, Koch A, Breuhahn K, Schirmacher P, Müller M, Kern MA, *mitochondrial dependent apoptosis induced by specific cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor SC-58635 in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines*. 13th AEK/AIO Cancer Congress, Würzburg, 2005

Haugg AM, Koch A, Lorenz K, Hill P, Eiteneuer E, Breuhahn K, Schirmacher P, Müller M, Kern MA, Rasche Induktion der Mitochondrien-vermittelten Apoptose durch spezifische Cyclooxygenase (COX)-2 Inhibitoren in HCC-Zellen, 21. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Ulm, 2005.

Kern MA, **Hagg AM**, Koch A, Eiteneuer E, Dienes HP, Breuhahn K, Müller M, Schirmacher P, *Apoptoseinduktion im hepatozellulären Karzinom durch COX-2 Blockierung ist mit mitochondrialer Cytochrom-c-Freisetzung assoziiert.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Rostock, 2004.

Kern MA, **Hagg AM**, Eiteneuer E, Konze E, Drebbler U., Dienes HP, Breuhahn K, Schirmacher P, Kasper HU, *Ex vivo Untersuchung antitumorigener Substanzen in humanen Gewebeschnittkulturen. Einfluss der Cyclooxygenase-2 Blockierung im hepatozellulären Karzinom.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Rostock, 2004.

Auszeichnungen

Posterpreis 6th Congress of the European Hepato-Pancreato-Biliary Association, Heidelberg, 2005

Danksagung an...

...Prof. Dr. Peter Schirmacher, Pathologisches Institut, Universitätsklinik Heidelberg, für die stets wertvollen Anregungen und kritischen Diskussionen, sowie die Möglichkeit, Experimente in Kooperation mit PD Dr. Müller-Schilling an der Universitätsklinik Heidelberg durchzuführen.

...Prof. Dr. Jens Brüning, Institut für Genetik, Universität zu Köln, für die hilfreiche Diskussion und für die freundliche Bereitschaft die Betreuung seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu übernehmen und Erstgutachter dieser Arbeit zu sein.

...Prof. Dr. Martin Krönke, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektiologie und Hygiene, Universitätsklinik Köln, für seine Tätigkeit als Zweitgutachter.

...Prof. Dr. Helmut W. Klein, Institut für Biochemie, Universität zu Köln, für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

...Dr. Matthias Cramer, Institut für Genetik, Universität zu Köln für seine spontane Zusage als Beisitzer der Disputation.

...PD Dr. Michael Kern für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Für die zahlreichen hilfreichen Gespräche und Diskussionen, die mir wertvolle Anregungen gaben und mir halfen, den Überblick zu behalten. Für die Ermöglichung der externen Arbeiten an der Universitätsklinik Heidelberg in Kooperation mit PD Dr. M. Müller-Schilling. Für die Förderung, wissenschaftliche Beiträge aus dieser Arbeit in Publikationen und auf Kongressen zu präsentieren.

...PD Dr. Martina Müller-Schilling, Innere Medizin IV, Universitätsklinik Heidelberg, für die kooperative Zusammenarbeit, für die Möglichkeit als Gast in ihrem Labor die Methode der FACS-Messungen zu erlernen, Versuche durchzuführen, für die uneingeschränkte Nutzung der Labormöglichkeiten, die wissenschaftliche Förderung dieser Arbeit sowie die zahlreichen anregenden Diskussionen und ihre Anteilnahme an dem Erfolg dieser Arbeit.

...Prof. Dr. P. H. Kramer, DKFZ Heidelberg, für die Möglichkeit als Gast an den wöchentlichen Seminaren seiner Arbeitsgruppe teilnehmen zu dürfen.

...die Kooperationspartner:

Dipl. Biol. Binje Fleischer und PD Dr. Henning Schulze-Bergkamen, Innere Medizin I, Universitätsklinik Mainz, für die Bereitstellung der mcl-1-cDNA und die Hilfe beim Etablieren der Methode.

PD Dr. H. Walczak, DKFZ Heidelberg, für die Gabe von LZ-TRAIL und der Möglichkeit FACS-Messungen in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Prof. Dr. Trautwein, Medizinische Klinik III, Universitätsklinik Aachen für die Zusendung der das FADD Δ -Konstrukt tragenden Adenoviren.

Prof. Dr. Friess und Dr. Michalski, Chirurgische Klinik der Universitätsklinik Heidelberg für die zuverlässige und sorgfältige Bereitstellung des Patientenmaterials.

...PD Dr. Karsten Brand, Pathologisches Institut, Universitätsklinik Heidelberg, für die freundliche Bereitstellung von β -GAL-Viren.

...PD Dr. Tobias Schilling, Innere Medizin I, Universitätsklinik Heidelberg, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

...die Mitarbeiter des ehemaligen Labors von Prof. Peter Schirmacher, PD Dr. Michael Kern und Dr. Kai Breuhahn, Institut für Pathologie der Universitätsklinik Köln, Maryam Bahlo, Dr. Mirja Schöneweiß und Tina Wertenbruch für Ihre Kollegialität. Mein besonderer Dank gilt Katharina Wendland, Silke Kummer und Elisabeth Konze für die professionelle Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und ihre überaus kollegiale und freundliche Art der Zusammenarbeit. Dieser Dank gebührt ebenfalls meinem Kollegen Dr. Sebastian Vreden, der durch seine freundschaftliche und hilfsbereite Kollegialität maßgeblich zu einer mitmenschlichen Arbeitsatmosphäre beigetragen hat.

...die Mitarbeiter des Labors von Prof. Dr. Peter Schirmacher, PD Dr. Michael Kern und Dr. Kai Breuhahn, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Heidelberg, Dr. Stephanie Schnickmann, Dr. Tanja Nussbaum, Elisabeth Specht und Antje Brauckhoff. Besonders erwähnen möchte ich hier Dr. Kai Breuhahn für seine Hilfe im Laboralltag sowie das Einbringen seiner wissenschaftlichen Kompetenz. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Eva Eiteneuer für ihre Professionalität.

...die Mitarbeiter des Labors von PD Dr. Martina Müller-Schilling: Katja Lorenz, Dr. Andreas Koch, Petra Hill, Sarah Gagiannis, Dr. Olav Gressner, Gisela Schwahn und Elisa Schulze-Schleithoff. Sie alle haben mich, ohne Ausnahme, freundlich, kollegial und vorbehaltlos als Gast in ihrem Labor aufgenommen und sind mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Katja Lorenz für die kompetente Einarbeitung in die Methode der FACS-Messungen und der entsprechenden Färbetechniken; bei Dr. Andreas Koch für seine wertvolle Hilfe. Ich habe von ihm sehr viel über Versuchsplanung und Versuchsmanagement gelernt. Bei Petra Hill für die Tipps und Tricks bei der Western-Blotanalyse.

...die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Köln, insbesondere Prof. Dr. Dienes, Fr. Ingeborg Baum, PD Dr. Uta Drebber, Elli Haskamp, PD Dr. Udo Kasper, Steffi Landsberg, Dr. Margarete Odenthal, Tanja Roth, Dr. Udo Siebolts und PD Dr. Claudia Wickenhauser, sowie an die Mitarbeiter des Pathologischen Instituts Heidelberg, Prof. Irina Berger, Dipl. Biol. Obul Reddy Bandapalli, PD Dr. Susanne Dihlmann, PD Dr. Volker Ehemann, Dr. Christa Flechtenmacher, Dr. Thomas Longerich, PD Dr. Gunhild. Mechtersheimer, Marion Nieder, Dr. Roland Penzel, Dipl. Biol. Claudia Schiller und Dr. Beate Straub, welche meine Arbeit stets mit Interesse verfolgt haben.

...Korinna und Sebastian Vreden für Ihre Freundschaft und den bedingungslosen Rückhalt im für mich harten Jahr 2007.

...Herrn Oberstudienrat a. D. Herbert Hinterkeuser für die Übersendung des altgriechischen Textes des Eingangszitates und der aufschlussreichen Quellenangabe.

...die Menschen, die mir durch ihre Freundschaft und Anteilnahme immer wieder Kraft gaben: Dr. Barbara Dieling-Mavridis für die Kontinuität und die guten Gespräche. Susanne und Dr. Hermann Schwander für die Übernachtungsmöglichkeit während des Kongresses in Würzburg. Rita Brychzy, für die Zeit in Paris. Beatrix Erhard für den unvergesslichen Besuch in Heidelberg. Meiner langjährigen Freundin Susanne Schneck für die schönen Tage in Berlin.

...Herrn Oberstudienrat a. D. Karl-Heinz Ernstberger für die gute Nachbarschaft und die Durchsicht englischsprachiger Manuskripte. Frau Randel, Karina und Jürgen Floßdorf, für die angenehme Nachbarschaft in Heidelberg und Köln.

...Madame Odette Pelzer, Benoit und Geraldine Pelzer, Edith und Prof. Dr. Ive Pelzer-Crama, Francoise und Olivier Pelzer, Edie und Myriam Mülender, Marc und Josianne Vanderhaghen, Marc und Carine Reul, Suzanne Duvres und Charles Herion für die freundliche Aufnahme in Belgien.

...Meinem Bruder Gerhard Haugg und Gerhilt Dietrich für die schönen Stunden bei Schachspiel und original bayuvarischer Verköstigung im Bergischen Land.

...Prof. Dr. Geukens, für die schnelle und kompetente Notoperation sowie die ärztliche und menschliche Hilfe in der Zeit danach.

...meine Mutter Anna Haugg, für Dein permanentes Mutmachen und dass Du immer für mich da bist.

...Vincent, für Deine Liebe.

Schlusserklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jens Brüning betreut worden.