

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	13
1.1 Apoptose: Programmierter Zelltod	13
1.2 Apoptosesignalwege	14
1.2.1 Caspasen als zentrale Exekutionsfaktoren: Nomenklatur und Aktivierung	14
1.2.2 Rezeptorvermittelte Apoptose	18
1.2.3 Mitochondrial vermittelte Apoptose	19
1.2.4 Apoptoseinduktion durch das Endoplasmatische Retikulum (ER)	21
1.3 Organellenspezifische Apoptose-Regulatoren	22
1.3.1 Die Bcl-2 Proteinfamilie	22
1.3.2 Regulation mitochondrialer Apoptose	23
1.3.2.1 Beeinflussung des Membranpotentials durch BH3-Only-Proteine	24
1.3.2.2 Modelle zur Änderung des mitochondrialen Membranpotentials	26
1.3.3 Regulation am Endoplasmatischen Retikulum (ER)	27
1.4 Regulation von Caspase-Aktivität und proapoptischen Faktoren	
„Inhibitors of Apoptosis Proteins“ (IAP`s)	28
1.4.1 Regulation von IAP`s durch Smac/DIABLO	30
1.4.2 Weitere Faktoren zur Regulation von IAP`s	32
1.4.3 Proapoptische mitochondriale Faktoren	33
1.5 Zielsetzung	36
2. Material	37
2.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien	37
2.2 Materialien zur DNA-Präparation und Modifikation	38
2.2.1 Verwendete Bakterienstämme	38
2.2.2 Verwendete Oligonukleotide	38
2.3 Materialien für SDS-PAGE und Western Blot-Analyse	39
2.3.1 Primäre Antikörper für die Western Blot-Analyse	39
2.3.2 Sekundäre Antikörper für die Western Blot-Analyse	39
2.4 Antikörper und Reagenzien für die Immunfluoreszenz	40
2.5 Zelllinien und Medien	40

3. Methoden	42
3.1 Molekularbiologische Standardmethoden	42
3.1.1 Restriktion und Fällung von DNA	42
3.1.2 Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA	42
3.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	42
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.2 Klonierung	43
3.2.1 Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.2.2 Herstellung und Transformation von Hitzeschock-kompetenten <i>E. coli</i> <i>DH5α</i> und <i>E. coli BJ5183</i>	43
3.2.3 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> DH5 α	44
3.2.4 DNA-Präparation	44
3.2.5 DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung	45
3.3 Zellkultur	45
3.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	45
3.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	45
3.3.3 Aufbewahrung vitaler Zellen	46
3.4 Gentransfer in eukaryotische Zellen	46
3.4.1 Calcium-Phosphat-Transfektion	46
3.4.2 Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Adenoviren	46
3.4.3 Herstellung stabiler Bcl-x _L HCT116 Transfektanten durch retrovirale Infektion	46
3.4.4 Nachweis der Transduktionseffizienz eukaryotischer Zellen (β -Galaktosidase-Färbung)	47
3.5 Adenoviren	48
3.5.1 Klonierung des Shuttle-Plasmids	48
3.5.2 Homologe Rekombination und Amplifikation des adenoviralen Plasmids	49
3.5.3 Transfektion von HEK293-Zellen zur Produktion der rekombinanten Adenoviren	49
3.5.4 Virusamplifikation	50
3.5.5 Virusaufreinigung	50
3.5.5.1 Ultrazentrifugation	50
3.5.5.2 Säulenaufreinigung	51
3.5.5.3 Bestimmung der „Plaque-Forming Units“ (pfu) durch Titration	51
3.5.5.4 Partikelmessung	51

3.5.5.5 Test auf replikationskompetente Viren mittels E1A-PCR	52
3.6 Proteinchemische Methoden	53
3.6.1 Gewinnung von Zellysaten	53
3.6.2 Gewinnung von zytosolischen Extrakten	53
3.6.3 Proteinbestimmung	53
3.6.4 Gelelektrophorese von Proteinen	54
3.6.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	55
3.6.6 Antikörperdetektion	55
3.7 Durchflußzytometrie	56
3.7.1 Modifizierte Zellzyklusanalyse	56
3.7.2 Bestimmung von Nekrose und Apoptose durch Annexin-V-FITC / Propidiumjodid-Färbung	56
3.7.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$)	57
3.7.4 Bestimmung von Pan-Caspase-Aktivität	57
3.7.5 Messung des Calcium-Effluxes aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER)	58
3.8 Immunfluoreszenz	59
4. Ergebnisse	60
4.1 Konstruktion und Charakterisierung eines rekombinanten Adenovirus zur konditionalen Überexpression von Smac	60
4.1.1 Herstellung der adenoviralen Plasmide und Generierung eines induzierbaren rekombinanten Adenovirus	60
4.1.2 Nachweis der Replikationsinkompetenz und Titerbestimmung von Ad-Smac	62
4.1.3 Nachweis der adenoviralen Transduktionseffizienz eukaryotischer Zellen	62
4.1.4 Nachweis der Transgenexpression durch Western Blot-Analyse	63
4.1.5 Nachweis der Transgenexpression mittels Immunfluoreszenz	64
4.2 Untersuchung der Aktivierung von Signalwegen bei der Smac-induzierten Apoptose	66
4.2.1 Bax-unabhängige Apoptoseinduktion durch adenovirale Expression von Smac in HCT116 endogenen Bax-exprimierenden Kontrollzellen und Bax ^{-/-} Colon-Karzinomzellen	66
4.2.2 Apoptoseinduktion durch adenovirale Expression von Smac in DU145 mock und DU145 Bax Prostata-Karzinomzellen	67

4.2.3	Analyse Apoptose-assoziiierter Proteine nach Infektion mit Ad-Smac	69
4.3	Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch Ad-Smac von der Überexpression von Bcl-x_L	72
4.3.1	Generierung Bcl-x _L -überexprimierender HCT116 Zellen	72
4.3.2	Bestätigung der biologischen Wirksamkeit des überexprimierten Bcl-x _L	73
4.3.3	Die Apoptoseinduktion durch Smac-Expression ist nicht durch Bcl-x _L hemmbar	74
4.4	Die Smac-induzierte Caspase-Aktivierung in Abhängigkeit von Bax und Bcl-x_L	75
4.5	Die Rolle der Mitochondrien bei der Smac-induzierten Apoptose	77
4.5.1	Änderung des mitochondrialen Membranpotentials	77
4.5.2	Freisetzung von Cytochrom c	79
4.6	Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) bei der Apoptoseinduktion durch Smac	81
4.7	Einfluß von selektiven Caspase-Inhibitoren auf die Smac-induzierte apoptotische DNA-Fragmentierung	83
4.8	Abhängigkeit der Smac-induzierten Apoptose von Caspase-3 in MCF-7 Mammakarzinom-Zellen	85
4.8.1	Untersuchung der apoptotischen Zelltodinduktion durch Smac	85
4.8.2	Untersuchung der nekrotischen Zelltodinduktion durch Smac	86
4.8.3	Sensitivierung der Zytostatika-resistenten MCF-7 Zellen durch die exogene Expression von Smac	88
5.	Diskussion	90
5.1	Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Smac	90
5.1.1	Die adenovirale Expression von Smac induziert Apoptose in humanen Karzinomzelllinien ist unabhängig von Bax und Bcl-x _L	90
5.1.2	Die Prozessierung und Aktivierung Apoptose-relevanter Caspasen durch Smac-Expression ist unabhängig von Bax	93
5.2	Der Einfluß von Caspasen auf die Smac-induzierte Apoptose	95
5.3	Die Rolle der Mitochondrien bei der Smac-induzierten Apoptose	97
5.3.1	Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und Amplifikation der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade	97
5.3.1.1	Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials	98

5.3.1.2 Freisetzung von Cytochrom c	100
5.4 Die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums bei der Smac-induzierten Apoptose	101
5.4.1 Der Einfluß von Calcium auf die Smac-induzierte Apoptose	102
5.4.2 Die Rolle von Caspasen am Endoplasmatischen Retikulum	103
5.5 Sensitivierung von MCF-7 Zellen für Zytostatika-induzierte Apoptose - Einsatzmöglichkeiten von Smac/DIABLO in der Tumorthherapie	104
5.6 Modell zur Smac-vermittelten Apoptose: Fazit und Ausblick	106
6. Zusammenfassung	108
7. Summary	110
8. Literaturverzeichnis	112
9. Lebenslauf	125
10. Publikationen	126