

**Antagonisierung von Zytostatika- und Thermoresistenz  
durch Überexpression Apoptose-fördernder Mitglieder  
der Bcl-2-Familie**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften- Dr. rer. nat.-

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Diplom-Chemikerin  
Silke Radetzki

Berlin, Juni 2002

Die vorgelegte Arbeit wurde an der Charité, Campus Berlin-Buch, Robert-Rössle-Klinik, in der Abteilung Immun- und Gentherapie von Prof. Dr. B. Dörken, in der Arbeitsgruppe von Dr. P.T. Daniel angefertigt.

Disputation: 05.03.2003

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Dörken

## Abkürzungen

Adr	Adriamycin
AIF	Apoptosis inducing factor
ANT	Adenine nucleotid translocator
APAF	Apoptosis associated factor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2 gene
BH	Bcl-2 homologous domain
Bik	Bcl-2 interacting killer
BRCA	Breast cancer gene
CAD	Caspase activated deoxyribonuclease
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
CARD	Caspase recruitment domain
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonium-1-propansulfat
CMV	Cytomegalievirus
Cyt c	Cytochrom c
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DDF	DNA fragmentation factor 45
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotential
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas associated protein with death domain

## Abkürzungen

---

FBS	Foetal bovine serum
FLICE enzyme	Fas associated death domain-like interleukin-1beta-converting
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FSC	Forward scatter
G418	Geneticin 418
HE	Dihydroethidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure)
H <sub>2</sub> DCF	2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
HRP	Horse radish peroxidase
Hsp	Hitzeschockproteine
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IC <sub>50</sub>	Hemmungskonzentration, bei der 50 % Hemmung vorliegt
ICAD	Inhibitor of CAD
ICE	Interkeukin-1-convertig enzyme
I.E.	Internationale Einheiten
JC-1	5, 5', 6, 6'-Tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbo- cyaniniodid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KIE	Kallidiogenase-Inaktivator-Einheiten
LRP	Lung resistance-related protein
MAP	Mitogen-activated protein
MEM	Minimum essential medium
Mdm2	Mouse double minute-2 Protein
MDR-1	Multidrug resistance
MRP	Multidrug resistance related protein
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
N-Ac	N-Acetylcystein
Nbk	Natural born killer
pAb	Polyclonal antibody
PAGE	Polyacrylamide gel elektrophoresis
PARP	Poly-ADP ribose polymerase

## Abkürzungen

---

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNa	p-Nitroanilin
PT	Permeability transition
ROS	Reactive oxygen species
ROI	Reactive oxygen intermediates
Rh	Rhodamin
RB	Retinoblastom
RAIDD	Receptor interacting protein (RIP) –associated ICH-1 homologous protein with death domain
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium dodecylsulfate
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TM	Transmembrandomäne
UPR	Unfolded protein response
VDAC	Voltage-dependent anion channel

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Deregulation von Apoptose in Tumoren	1
1.2. Therapie und Resistenz bei Krebserkrankungen	2
1.2.1. Das Mammakarzinom	2
1.2.2. Chemotherapie	3
1.2.2.1. Epipodophyllotoxin: Etoposid	4
1.2.2.2. Anthrazykline	6
- DNA-Interkalation	7
- Hemmung der Topoisomerase II	7
- Bildung von Sauerstoffradikalen	7
1.2.2.3. Taxol	8
1.2.3. Hyperthermie	9
1.2.3.1. Hyperthermie als Therapiekonzept	9
1.2.3.2. Hyperthermie-induzierte Veränderungen in der Zelle	10
1.2.4. Chemotherapieresistenz	11
1.2.4.1. MDR-1-Phänotyp	11
1.2.4.2. Überwindung der MDR-1-Resistenz	12
1.3. Apoptose	14
1.3.1. Apoptose und Nekrose	14
1.3.2. Apoptosesignalwege	15
1.3.2.1. Rezeptor-vermittelte Apoptose	16
1.3.2.2. Mitochondrien-vermittelte Apoptose	17
1.3.2.3. Endoplasmatisches-Reticulum-induzierte Apoptose	19
1.3.3. Die Bcl-2 Familie	19
1.3.3.1. Struktur der Proteine der Bcl-2 Familie	20
1.3.3.2. Funktion der Proteine der Bcl-2 Familie	23
- Bcl-2	25
- Bak	26
- Bik/Nbk	26

1.3.4. Caspasen	27
1.3.4.1. Struktur der Caspasen	27
1.3.4.2. Caspase-Substrate	28
1.3.4.3. Caspase-Signalwege	28
1.3.5. Apoptose und Zellzyklus	29
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>32</b>
<b>3. Material</b>	<b>33</b>
3.1 Chemikalien und Reagenzien	33
3.2. Puffer und sonstige Lösungen	33
3.3. Antikörper	35
3.4. Zellkultur	36
3.5. Zelllinien	36
<b>4. Methoden</b>	<b>38</b>
4.1. Molekularbiologische Standardmethoden	38
4.2. Vektorkonstruktion	38
4.3. Zellkultur	39
4.3.1. Allgemeine Kulturbedingungen	39
4.3.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	40
4.3.3. Aufbewahrung eukaryontischer Zellen	40
4.3.4. Gentransfer in eukaryontische Zellen mittels Elektroporation	40
4.4. Analyse der Transgenexpression	41
4.4.1. Proteinpräparation	41
4.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	41
4.4.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit BCA-Reagenz (Pierce)	42
4.4.4. Gelelektrophorese von Proteinen	42
4.4.5. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	43
4.4.6. Proteinnachweis mittels Antikörper	43
4.5. Durchflußzytometrie	44

4.6. Apoptosenachweisverfahren	45
4.6.1. Modifizierte Zellzyklusanalyse	45
4.6.2. Morphologische Veränderungen und Messung der Membranintegrität	46
4.7. Nachweis des MDR-1 Phänotyps	47
4.7.1. Immunfluoreszenz	47
4.7.2. Rhodaminefflux	47
4.8. Indirekte Viabilitätsbestimmung mit dem MTT-Test	48
4.9. Messung von Zytostatikaaufnahme und -efflux	49
4.10. Gewinnung von Zellextrakten	49
4.11. Messung der Caspase-3-Aktivität	50
4.11.1. Messung der Enzymaktivität nach <i>in vitro</i> Aktivierung	50
4.11.2. Caspase-3-Aktivitätstest	50
4.12. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials	50
4.13. Messung von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten bei Zytostatika-induzierter Apoptose	51
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>53</b>
5.1. Antagonisierung von Chemoresistenz	53
5.1.1. Zellliniencharakterisierung	53
5.1.1.1. Messung der Zytostatikasensitivität	53
5.1.1.2. Untersuchung möglicher Resistenzursachen	56
5.1.2. Stabile Bak- und Bik/Nbk-Transfektanten	59
5.1.2.1. Vektorkonstruktion	59
5.1.2.2. Generierung von Bak- und Bik/Nbk-Transfektanten	59
5.1.2.3. MDR-1 Expression und Zytostatikaefflux	61
5.1.2.4. Messung der Zytostatikasensitivität	65
5.1.2.5. Änderung des mitochondrialen Membranpotentials	69
5.1.2.6. Caspase-3-Aktivität	71
5.1.2.7. Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach Behandlung mit Epirubicin in MT1-Adr-Transfektanten	73
5.1.2.8. Messung von Sauerstoffradikalen im MT1-Adr-Zellsystem	74
5.2. Revertierung von Thermoresistenz	77

5.2.1. Zellliniencharakterisierung	77
5.2.2. Stabile Bak-Transfektanten einer thermoresistenten Zelllinie	78
5.2.2.1. Viabilitätsbestimmung nach Hyperthermie	79
5.2.2.2. Messung von Hyperthermie-induzierter Apoptose	80
5.2.2.3. Expression Hyperthermie- und Apoptose-assoziiierter Proteine	81
<b>6. Diskussion</b>	<b>83</b>
6.1. Erhöhung der Zytostatikasensitivität	83
6.1.1. Die Bcl-2-Familie beeinflusst Zytostatika-induzierte Apoptose	83
6.1.2. Zusammenhang von Zytostatika-Efflux und MDR-1-Expression	84
6.1.3. Bik und Bak antagonisieren Resistenz gegenüber Anthrazyklin-induzierter Apoptose	85
6.1.4. Beeinflussung der Kreuzresistenz gegenüber Chemotherapeutika	86
6.1.5. Mechanismus der Sensitivierung Zytostatika-induzierter Apoptose	87
6.1.5.1. Erhöhung der Caspase-Aktivität	88
6.1.5.2. Beeinflussung der Mitochondrienaktivität	88
6.1.5.3. Bildung reaktiver Sauerstoffradikale	91
6.1.6. Expression Apoptose-assoziiierter Proteine	93
6.2. Erhöhung der Thermosensitivität	95
6.2.1. Bak revertiert Hyperthermie-Resistenz	95
6.2.2. Beeinflussung der Expression Hyperthermie- und Apoptose-assoziiierter Proteine	96
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>8. Ausblick</b>	<b>101</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>Eigene Publikationen und Poster</b>	
<b>Lebenslauf</b>	
<b>Danksagung</b>	