

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis   | 10        |
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>13</b> |
| <b>1.1 Apoptose: Programmierter Zelltod</b>                                 | <b>13</b> |
| <b>1.2 Apoptosesignalwege</b>   | <b>14</b> |
| 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        |
| <b>1.3 Organellspezifische Apoptose-Regulatoren</b>                         | <b>22</b> |
| 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        |
| <b>1.4 Regulation von Caspase-Aktivität und proapoptischen Faktoren</b>     |           |
| <b>„Inhibitors of Apoptosis Proteins“ (IAP`s)</b>                           | <b>28</b> |
| 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        |
| <b>1.5 Zielsetzung</b>  | <b>36</b> |
| <b>2. Material</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien</b>                            | <b>37</b> |
| <b>2.2 Materialien zur DNA-Präparation und Modifikation</b>                 | <b>38</b> |
| 2.2.1 Verwendete Bakterienstämme  | 38        |
| 2.2.2 Verwendete Oligonukleotide  | 38        |
| <b>2.3 Materialien für SDS-PAGE und Western Blot-Analyse</b>                | <b>39</b> |
| 2.3.1 Primäre Antikörper für die Western Blot-Analyse                       | 39        |
| 2.3.2 Sekundäre Antikörper für die Western Blot-Analyse                     | 39        |
| <b>2.4 Antikörper und Reagenzien für die Immunfluoreszenz</b>               | <b>40</b> |
| <b>2.5 Zelllinien und Medien</b>  | <b>40</b> |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. Methoden</b>   | <b>42</b> |
| <b>3.1 Molekularbiologische Standardmethoden</b>   | <b>42</b> |
| 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        |
| <b>3.2 Klonierung</b>  | <b>43</b> |
| 3.2.1 Ligation von DNA-Fragmenten  | 43        |
| 3.2.2 Herstellung und Transformation von Hitzeschock-kompetenten <i>E. coli</i><br><i>DH5<math>\alpha</math></i> und <i>E. coli BJ5183</i> | 43        |
| 3.2.3 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$  | 44        |
| 3.2.4 DNA-Präparation  | 44        |
| 3.2.5 DNA-Sequenzierung und Sequenzauswertung  | 45        |
| <b>3.3 Zellkultur</b>  | <b>45</b> |
| 3.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen   | 45        |
| 3.3.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität  | 45        |
| 3.3.3 Aufbewahrung vitaler Zellen  | 46        |
| <b>3.4 Gentransfer in eukaryotische Zellen</b>   | <b>46</b> |
| 3.4.1 Calcium-Phosphat-Transfektion  | 46        |
| 3.4.2 Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Adenoviren  | 46        |
| 3.4.3 Herstellung stabiler Bcl-x <sub>L</sub> HCT116 Transfektanten durch retrovirale Infektion  | 46        |
| 3.4.4 Nachweis der Transduktionseffizienz eukaryotischer Zellen<br>( $\beta$ -Galaktosidase-Färbung)                                       | 47        |
| <b>3.5 Adenoviren</b>  | <b>48</b> |
| 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<br>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        |
| <b>3.6 Proteinchemische Methoden</b>  | <b>53</b> |
| 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        |
| <b>3.7 Durchflußzytometrie</b>  | <b>56</b> |
| 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        |
| <b>3.8 Immunfluoreszenz</b>   | <b>59</b> |
| <br>  |           |
| <b>4. Ergebnisse</b>  | <b>60</b> |
| <b>4.1 Konstruktion und Charakterisierung eines rekombinanten Adenovirus zur konditionalen Überexpression von Smac</b>  | <b>60</b> |
| 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        |
| <b>4.2 Untersuchung der Aktivierung von Signalwegen bei der Smac-induzierten Apoptose</b>   | <b>66</b> |
| 4.2.1 Bax-unabhängige Apoptoseinduktion durch adenovirale Expression von Smac in HCT116 endogenen Bax-exprimierenden Kontrollzellen und Bax <sup>-/-</sup> 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        |
| <b>4.3</b> | <b>Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch Ad-Smac von der Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub></b>                               | <b>72</b> |
| 4.3.1      | Generierung Bcl-x <sub>L</sub> -überexprimierender HCT116 Zellen   | 72        |
| 4.3.2      | Bestätigung der biologischen Wirksamkeit des überexprimierten Bcl-x <sub>L</sub>   | 73        |
| 4.3.3      | Die Apoptoseinduktion durch Smac-Expression ist nicht durch Bcl-x <sub>L</sub> hemmbar   | 74        |
| <b>4.4</b> | <b>Die Smac-induzierte Caspase-Aktivierung in Abhängigkeit von Bax und Bcl-x<sub>L</sub></b>                                       | <b>75</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Die Rolle der Mitochondrien bei der Smac-induzierten Apoptose</b>   | <b>77</b> |
| 4.5.1      | Änderung des mitochondrialen Membranpotentials   | 77        |
| 4.5.2      | Freisetzung von Cytochrom c  | 79        |
| <b>4.6</b> | <b>Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) bei der Apoptoseinduktion durch Smac</b>                       | <b>81</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Einfluß von selektiven Caspase-Inhibitoren auf die Smac-induzierte apoptotische DNA-Fragmentierung</b>                          | <b>83</b> |
| <b>4.8</b> | <b>Abhängigkeit der Smac-induzierten Apoptose von Caspase-3 in MCF-7 Mammakarzinom-Zellen</b>                                      | <b>85</b> |
| 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        |
| <b>5.</b>  | <b>Diskussion</b>  | <b>90</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Smac</b>  | <b>90</b> |
| 5.1.1      | Die adenovirale Expression von Smac induziert Apoptose in humanen Karzinomzelllinien ist unabhängig von Bax und Bcl-x <sub>L</sub> | 90        |
| 5.1.2      | Die Prozessierung und Aktivierung Apoptose-relevanter Caspasen durch Smac-Expression ist unabhängig von Bax                        | 93        |
| <b>5.2</b> | <b>Der Einfluß von Caspasen auf die Smac-induzierte Apoptose</b>   | <b>95</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Die Rolle der Mitochondrien bei der Smac-induzierten Apoptose</b>   | <b>97</b> |
| 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        |
| <b>5.4 Die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums bei der Smac-induzierten Apoptose</b>  | <b>101</b> |
| 5.4.1 Der Einfluß von Calcium auf die Smac-induzierte Apoptose   | 102        |
| 5.4.2 Die Rolle von Caspasen am Endoplasmatischen Retikulum  | 103        |
| <b>5.5 Sensitivierung von MCF-7 Zellen für Zytostatika-induzierte Apoptose - Einsatzmöglichkeiten von Smac/DIABLO in der Tumortherapie</b> | <b>104</b> |
| <b>5.6 Modell zur Smac-vermittelten Apoptose: Fazit und Ausblick</b>   | <b>106</b> |
| <br>   |            |
| <b>6. Zusammenfassung</b>  | <b>108</b> |
| <b>7. Summary</b>  | <b>110</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis</b>   | <b>112</b> |
| <b>9. Lebenslauf</b>   | <b>125</b> |
| <b>10. Publikationen</b>   | <b>126</b> |