

Aus der Klinik für Innere Medizin I
(Direktor: Prof. Dr. med. S. Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE INTERAKTION VON CYTOKERATIN 18 UND ZAP90 IN DER
RETINOLSÄURE-INDUZIERTEN APOPTOSE BEI HEPATOCYLLÄREN
KARZINOMZELLINIEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

GÖTZ PETER HAGEMANN
aus Bad Karlshafen

Kiel 2009

1. Berichterstatter: _____ Prof. Dr. med. Ulrich R. Fölsch _____

2. Berichterstatter: _____ Prof. Dr. med. Fred Fändrich _____

Tag der mündlichen

Prüfung: _____ 01.09.2010 _____

Zum Druck genehmigt, Kiel, den _____ 01.09.2010 _____

gez. _____

1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS HEPATOZELLULÄRE KARZINOM	1
1.2 DIE BEDEUTUNG DER RETINOIDE	3
1.3 DIE REGULATION DER APOPTOSE	7
1.3.1 ABLAUF DER APOPTOSE	7
1.3.2 APOPTOSE-ASSOZIIERTE PROTEINKINASEN	9
1.4 VORKOMMEN UND FUNKTION VON CYTOKERATINEN	13
1.4.1 AUFBAU UND VERTEILUNG VON INTERMEDIÄRFILAMENTEN	13
1.4.2 DIE FUNKTION DER CYTOKERATINE	15
1.5 DAS ZAP90 PROTEIN	17
1.5.1 DIE PROTEINSTRUKTURLMOTIVE	17
1.5.2 DIE ZAP90-GENREGULATION	18
1.5.3 DIE MÖGLICHE FUNKTION VON ZAP90	19
1.6 ZIEL DER ARBEIT	20
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 MATERIAL	22
2.1.1 CHEMIKALIEN	22
2.1.2 KIT	23
2.1.3 ANTIKÖRPER	23
2.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN	24
2.1.5 GERÄTE	26
2.2 METHODEN	27
2.2.1 ZELLKULTUR UND STIMULATION	27
2.2.2 WESTERN-BLOT	28
2.2.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	31
2.2.4 siRNA	33
3. ERGEBNISSE	36
3.1 APOPTOSEINDUKTION DURCH RETINOIDE	36
3.1.1 APOPTOSEMESSUNG MITTELS CK18	36

3.1.2 ZEITKINETIK DER RETINOLSÄURE-INDUZIERTEN APOPTOSE _____	40
3.1.3 KONZENTRATIONS KINETIK DER RETINOLSÄURE-INDUZIERTEN APOPTOSE _____	45
3.2 DIE MAP-KINASEN IN DER ALL-TRANS RETINOLSÄURE-VERMITTELTEN APOPTOSE _	48
3.2.1 ANALYSE DER FCS-PRÄINKUBATION _____	48
3.2.2 TPA AKTIVIERT DIE P44/42MAPK _____	50
3.3 DER AKT-SURVIVAL-SIGNALWEG IN DER ALL-TRANS RETINOLSÄURE-INDUZIERTEN APOPTOSE _____	51
3.3.1 PHAKT-INHIBITION DURCH ATRA UND LY294002 _____	51
3.3.2 siRNA AKT-TRANSLATIONSHEMMUNG _____	52
3.4 FAS- UND ALL-TRANS RETINOLSÄURE-VERMITTELTE APOPTOSE IM VERGLEICH _____	54
3.5 INTRAZELLULÄRE ZAP90-VERTEILUNG UND CYTOKERATIN- Co-LOKALISATION _____	56
<u>4. DISKUSSION</u>	61
4.1 RETINOLSÄURE INDUZIERT APOPTOSE _____	61
4.2 ANALYSE DER RETINOLSÄURE-VERMITTELTEN APOPTOSE _____	62
4.2.1 FCS REDUZIERT DIE RETINOLSÄURE-VERMITTELTE APOPTOSE _____	62
4.2.2 DIE AKTIVITÄT DER P44/42-MAP-KINASE WIRD DURCH ALL-TRANS RETINOLSÄURE NICHT BEEINFLUSST, DIE STIMULATION DER P44/42-MAP-KINASE SCHWÄCHT DIE RETINOLSÄURE-VERMITTELTE APOPTOSE AB _____	63
4.2.3 ALL-TRANS RETINOLSÄURE INHIBIERT DEN AKT-SURVIVAL-SIGNALWEG _____	64
4.2.4 UNTERSUCHUNG DER FAS-ABHÄNGIGEN APOPTOSE _____	66
4.2.5 TRANSDUKTIONSKASKADEN DER RETINOLSÄURE-VERMITTELTEN APOPTOSE _____	67
4.3 MULTIMODALE THERAPIEKONZEPTE DES HEPATOZELLULÄREN KARZINOMS _____	69
4.3.1 HCC-THERAPIESTRATEGIEN _____	69
4.3.2 HCC-SEKUNDÄRPRÄVENTION _____	71
4.4 CK18 ALS APOPTOSEMARKER _____	73
4.5 DIE STRUKTURELLE INTERAKTION VON CK18 UND ZAP90 _____	74
4.5.1 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON CK18 _____	74
4.5.2 Co-LOKALISATION VON CK18 UND ZAP90 IN DER ALL-TRANS RETINOLSÄURE-INDUZIERTEN APOPTOSE _____	75
4.5.3 DER POTENTIELLE EINSATZ VON ZAP90 IN DER LABORCHEMISCHEN DIAGNOSTIK _	77
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	79

6. ANHANG	82
6.1 ABKÜRZUNGEN	82
6.2 LITERATURVERZEICHNIS	84
7. DANKSAGUNG	96
8. LEBENSLAUF	97

1. Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den weltweit häufigsten Tumoren und macht 84% aller Lebermalignome aus (El-Serag und Rudolph, 2007). Es ist mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 560000 Neuerkrankungen der fünfthäufigste Tumor des Mannes und der achthäufigste der Frau (Bosch *et al.*, 2004). Die Inzidenz variiert dabei weltweit und korreliert mit der Häufigkeit der viralen Hepatitis B-/C-Infektion. Während das HCC in Europa und in den USA seltener beobachtet wird, ist es in Teilen Asiens sowie Afrikas der häufigste maligne Tumor. Allerdings nimmt die Häufigkeit seit 1980 auch in den westlich-industrialisierten Ländern zu (El-Serag und Rudolph, 2007). Weltweit ist das HCC die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache. Mit einer medianen Überlebenszeit von etwa 8 Monaten nach Diagnosestellung in Europa zeigt das HCC eine hohe Sterblichkeit (Bosetti *et al.*, 2008).

Das HCC entsteht zu 90% auf dem Boden einer Zirrhose (Fattovich *et al.*, 2004). Es kann dabei multilokulär und metachron auftreten. Das Karzinomrisiko der Zirrhose korreliert stark mit Dauer und Ätiologie der Hepatopathie. Epidemiologisch gesicherte Risikofaktoren sind die chronischen Hepatitis B- und C-Virusinfektionen. In Ländern mit einem hohen Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms sind diese viralen Infektionen endemisch. Dies erklärt auch die Ausbildung des Tumors in jüngeren Bevölkerungsschichten. Erfolgreiche Hepatitis B-Impfprogramme haben in Asien die Inzidenzrate deutlich reduziert, während die HCC-Inzidenz bei der chronischen Hepatitis C weiter ansteigt (Fattovich *et al.*, 2004).

Neben einer Virushepatitis gehen auch andere Erkrankungen, wie die alkoholtoxische Zirrhose und die Hämochromatose, mit einem erhöhten HCC-Risiko einher (Bosch *et al.*, 2004).

Das HCC zeichnet sich durch seine genetische Heterogenität aus. In HCC-Zelllinien wurden Mutationen von Zellzyklus-assoziierten Regulatoren wie p27 (Ito *et al.*, 1999) gefunden und eine gesteigerte Expression der p44/42-MAP-Kinase nachgewiesen (Huynh *et al.*, 2003). Diese Aberrationen sind aber nicht spezifisch für das

hepatozelluläre Karzinom. Oft entstehen Mutationen im Verlauf der Tumorprogression. Molekulare Abweichungen sind dabei mit unterschiedlichen Prognosen verbunden. HCC-Typen mit einer kurzen Überlebenszeit zeigten eine erhöhte Expression von Proliferationsmarkern wie PCNA und Zellzyklusregulatoren wie CDK4, CCNB1, CCNA2 und CKS2 (Lee und Thorgeirsson, 2006). Weiterhin fand sich eine gesteigerte Expression von Genen, die an der Regulation antiapoptotischer Prozesse und am Ubiquitinierungssystem beteiligt sind (El-Serag und Rudolph, 2007).

Der lange asymptomatische Verlauf erschwert die Diagnose des primären Leberzellkarzinoms. Es zeigen sich uncharakteristische Beschwerden wie Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit und abdominelles Druckgefühl, neben Symptomen der Leberzirrhose und ihrer Dekompensationszeichen. Daher wird die Erkrankung meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt. Als diagnostisches Vorgehen bei Risikopatienten mit einer Leberzirrhose wird die Ultraschalluntersuchung und die Bestimmung des Alpha1-Fetoproteins (AFP) im 6-monatigen Abstand klinisch eingesetzt (Di Bisceglie, 2004). Es ist aber umstritten, ob diese Screeninguntersuchungen tatsächlich die HCC-Mortalität senken können (Daniele *et al.*, 2004). Kleine HCC-Herde (<2cm) sind durch die Zirrhose in der Bildgebung oder durch die Alpha1-Fetoprotein -Bestimmung nur schwer zu erfassen (Talwalkar und Gores, 2004). Zur rechtzeitigen Diagnosestellung fehlen weiterhin geeignete Serummarker.

Bildgebende radiologische Verfahren, wie CT und MRT, sind nicht als Screeninguntersuchungen geeignet. Sie dienen vor allem der Dokumentation der Ausdehnung und Abklärung der Operationsindikation. Durch Kontrastmittelgabe im CT, Lipidolangiographie oder Kontrastmittel-unterstützte Sonographie lassen sich die hypervaskularisierten Tumoren besser abgrenzen.

In der Differenzialdiagnose von Lebertumoren stellt die Histopathologie den Goldstandard dar (Hoofnagle, 2004).

Die bisher einzigen kurativen Therapieansätze sind die chirurgische Resektion und die Lebertransplantation (Carr, 2004). Aufgrund der Tumorlokalisation und Ausdehnung, sowie der Gefahr des postoperativen Leberversagens, ist bei Diagnosestellung nur eine geringe Anzahl der Patienten für eine Resektion geeignet.

Da das HCC multilokulär und metachron auf dem Boden einer Zirrhose auftritt, werden die Ergebnisse durch die Tumorrekurrenz beeinträchtigt. Durch *de novo* Transformationen liegt die Rezidivrate nach einer Resektion bei über 50% in fünf Jahren (El-Serag *et al.*, 2008). Dagegen berücksichtigt die Transplantation die multifokale Tumorlokalisierung und die zu Grunde liegende Lebererkrankung. Diese Therapieoption wird jedoch durch den Mangel an Spenderorganen eingeschränkt.

Lokale Ablationsverfahren wie perkutane Ethanolinjektion, Radiofrequenz-Thermoablation oder transarterielle Chemoembolisation, haben Eingang in die Behandlung gefunden (El-Serag *et al.*, 2008). Der Erfolg dieser Verfahren ist durch die multifokale Genese des hepatozellulären Karzinoms jedoch eingeschränkt: Sie eignen sich bei ausgewählten Patienten mit maximal 3 Tumorherden, die je einen maximalen Durchmesser von 3 cm besitzen (Carr, 2004).

Auch nicht-invasive Therapieoptionen sind durch die Zytostatika- und Strahlenresistenz des hepatozellulären Karzinoms begrenzt. In mehreren Studien ließ sich darunter kein prognostischer Gewinn erzielen (Carr, 2004). Es wird daher weiterhin nach Substanzen mit geringer Toxizität gesucht, die die Tumorfreiheit möglichst lange aufrechterhalten.

1.2 Die Bedeutung der Retinoide

Vitamin A und seine Derivate werden in der Gruppe der Retinoide zusammengefasst. Sie nehmen auf unterschiedliche Zellprozesse Einfluss. Die Retinoide sind an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Morphogenese beteiligt (Kojima *et al.*, 2004). Über Kontrolle von Initiation, Promotion und Progression greifen sie in die Karzinogenese verschiedener Tumore ein.

Die Leber ist das Speicherorgan für die lipophilen Vitamin A-Derivate. Im HCC kommt es zu einem Verlust an gespeicherten Retinoiden (Muto *et al.*, 1996). Dafür sind die verminderte Anzahl an Kupfferschen Sternzellen, die physiologischen Retinolsäure-Speicherzellen, im Tumorgewebe und der schnelle Metabolismus zur inaktiven Anhydroretinolsäure verantwortlich. Es wird diskutiert, ob ein Mangel an Retinoiden die Tumorgenese der Leber unterstützt. Tatsächlich führt Alkoholabusus, der die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms in Leberzirrhosen fördert, zu einem erniedrigten Retinolsäurespiegel im Lebergewebe (Adachi *et al.*, 1991).

Zudem gehen hohe Retinolsäurekonzentrationen im Serum von HBs-Ag (Hepatitis B Surface-Antigen)- Trägern mit einem verminderten HCC-Risiko einher (Yuan *et al.*, 2006). Dieser Aspekt führt zur Überlegung, durch Substitution von Retinoiden die Hepatozyten vor einer malignen Transformation schützen zu können.

Natürliche und synthetische biochemische Isoformen bilden die Gruppe der Retinoide. Folgende Metabolite werden unterschieden: Retinol stellt die Transportform dar, Retinylester ist die Speicherform im Gewebe, und Retinolsäure (RA) ist die aktive Wirkform in den Zellen (Okuno *et al.*, 2004). Es existieren die vier Isoformen all-trans RA, 9-cis RA, 13-cis RA und 9,13-di-cis RA (**Abb. 1.1**).

Provitamin A (Carotenoide) oder Retinylester werden über die Nahrung resorbiert. Aufgenommen und gespeichert werden die lipophilen Retinoide in der Leber. Im Blut werden sie mit Hilfe der Retinol-Bindungsproteine (RBP) und Albuminen transportiert. In den Zielzellen wird die RA an zelluläre RBPs (CRBP) gebunden und kann ihre Funktionen ausüben. Das Cytochrom P450 - System oxidiert sie zu inaktiven Metaboliten. Die intrazelluläre Konzentration wird physiologischerweise über eine Feedback-Kontrolle reguliert (Okuno *et al.*, 2004).

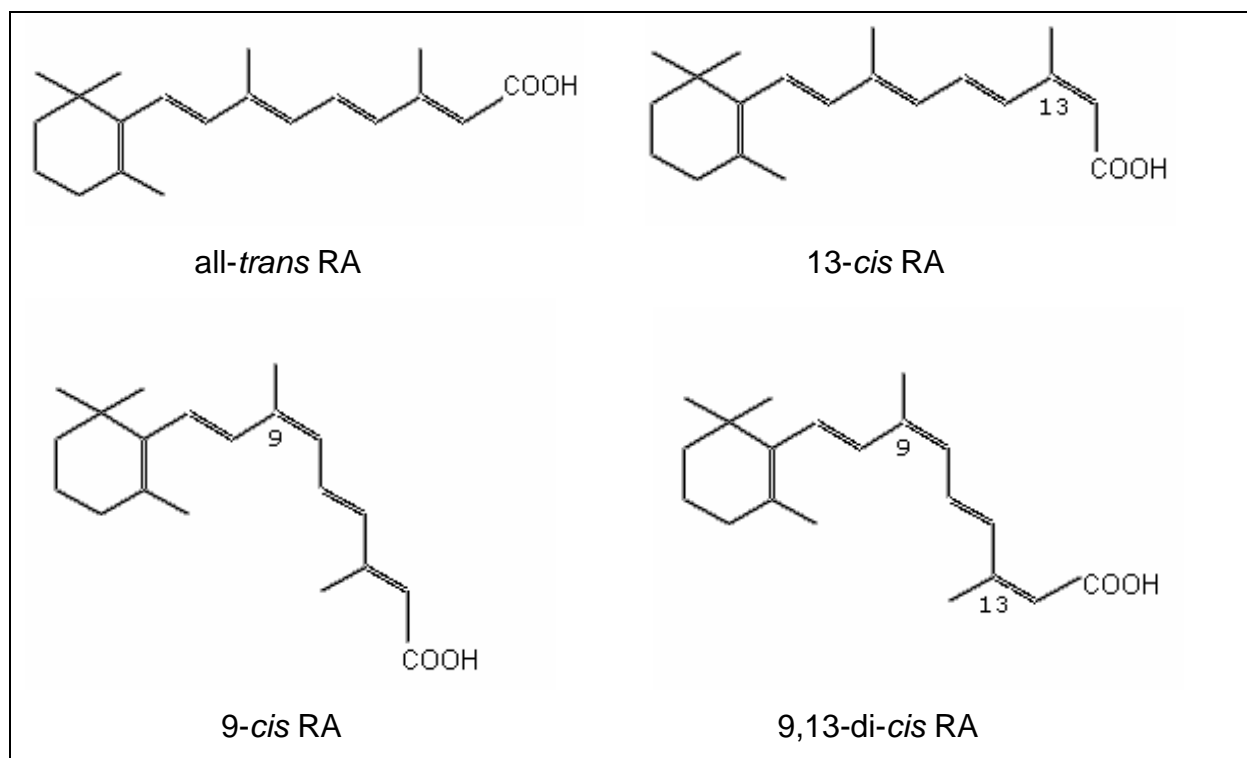


Abb. 1.1: Die vier Isoformen der natürlichen Retinolsäure in der Strukturformel.

Die Retinolsäure kann ihre regulierende Funktion in Bezug auf Wachstum und Differenzierung in der Zelle unter anderem über die zwei nukleären Rezeptoren RAR (retinoic acid receptor) und RXR (retinoic X receptor) vermitteln (Mangelsdorf, 1994). Beide setzen sich aus den drei Subtypen Alpha, Beta und Gamma zusammen. RAR interagiert mit atRA und allen cisRA-Isoformen, wohingegen an RXR nur 9-cis RA bindet. RXRs bilden Homo- und Heterodimere mit RARs oder anderen nukleären Hormonrezeptoren. Diese Dimere interagieren mit RARE- oder RXRE-Elementen und regulieren die Transkription verschiedener Gene. Über Bindung mit Cofaktoren wie HDAC (Histondeacetylase) und HAT (Histonacetyltransferase) wird die Expression bestimmter Gene aktiviert oder inhibiert.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass RAR β bei diversen Zelllinien als Tumorsuppressor-Gen wirkt (Sun und Lotan, 2002). Verstärkte RAR β Expression ging mit Wachstumshemmung einher, Deletion führte zu gesteigerter Tumorprogression. Weiterhin wurden in hepatozellulären Tumorzellen Funktionsstörungen der nukleären Rezeptoren festgestellt: Die proliferationsassoziierte MAP-Kinase p44/42 phosphoryliert RAR α (Kojima *et al.*, 2004). Dadurch wird der Retinolsäure-Rezeptor inhibiert, was zu einer Proliferationssteigerung der Hepatozyten führt.

In mehreren Versuchen wurde bei verschiedenen Zelllinien eine Apoptoseinduktion durch Retinolsäure nachgewiesen: In Neuroblastom- (Lovat *et al.*, 2000), B-Zell-Lymphom-Zellen (Sundaresan *et al.*, 1997) und bei Hepatozyten der Ratte (Falasca *et al.*, 1998) konnte durch Retinoid-Stimulation Apoptose ausgelöst werden. Durch azyklische Retinolsäure (Nakamura *et al.*, 1995 und Yasuda *et al.*, 2002) und durch die beiden Isoformen der natürlichen Retinolsäure all-trans und 9-cis RA (Arce *et al.*, 2005) konnte in mehreren HCC- und Hepatomzelllinien Apoptose induziert werden. Die zu Grunde liegenden Signalwege sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

In vorhergehenden Arbeiten (Fürst, 2008) wurde nachgewiesen, dass die Retinolsäure in humanen HepG2-Zellen transkriptionsunabhängig Apoptose induzieren kann. AtRA aktiviert die Stresskinasen JNK und p38. Diese Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) nehmen eine bedeutende Position in der Regulation verschiedener Zellprozesse, wie Entzündung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose ein. Die zentralen Regulatoren der Apoptose, die

Caspasen, wurden durch atRA transkriptionsunabhängig aktiviert. Demnach scheinen Retinoide neben der Transkriptionskontrolle auch andere Signalwege in der Zelle zu beeinflussen.

Nachdem der antineoplastische Effekt der Retinolsäure in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden konnte, zeigten auch klinische Studien eine Hemmung der Tumoprogession (Okuno *et al.*, 2004). Eine Phase II-Studie mit 13-cisRA und Interferon- α bei Patienten mit inoperablem Pankreaskarzinom zeigte eine bessere Verträglichkeit dieser Therapie im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika bei ähnlicher Überlebenszeit (Brembeck *et al.*, 1998). Eine Phase III-Studie wurde aus markttechnischen Gründen leider nicht initiiert.

Ein Beispiel für die klinische Anwendung von Retinoiden ist die Behandlung der akuten Promyelozytenleukämie (APL). Der Einsatz von atRA (Vesanoid®) führt in über 90% der Fälle zu einer kompletten Remission und steigert das Langzeitüberleben auf 75% (Okuno *et al.*, 2004).

Molekularpathologisch kommt es bei der APL durch eine chromosomale Translokation zu einer Fusion zwischen dem Retinolsäurerezeptor RAR α und dem Promyelozytenleukämie-Protein (PML). Es wird angenommen, dass PML-RAR α als dominant negativer Rezeptor den physiologischen Ablauf der intrazellulären Signalwege stört (Fenaux *et al.*, 2001). Sowohl PML als auch die Retinolsäure können ihre proliferationskontrollierende Funktion nicht mehr ausüben. AtRA induziert die Spaltung des Fusionsproteins und kann dadurch die Suppression der Transkription aufheben. Retinolsäure bewirkt die Differenzierung von leukämischen Blasten in funktionelle und phänotypisch normale Leukozyten (Fenaux *et al.*, 2001). Dadurch sind Zelldifferenzierung und ein normaler Zellumsatz wieder möglich (Phänomen der „terminalen Differenzierung“).

Beim hepatozellulären Karzinom zeigten Muto *et al.* (1996) eine Rezidivprophylaxe mit azyklischem Retinoid. Nach einer chirurgischen Resektion des hepatozellulären Karzinoms konnte eine 12-monatige orale Retinolsäure-Applikation (600mg Polypropenoidsäure/Tag) die Rezidivhäufigkeit signifikant reduzieren [Rezidivhäufigkeit von 49% auf 27% gesenkt, $p=0.04$]. In einer follow-up Studie nach 62 Monaten wurde die gesteigerte Überlebensrate durch Retinoid-Behandlung verifiziert (Muto *et*

al., 1999). Die kurze Retinolsäure-Behandlung hatte demnach einen langfristigen Effekt. Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren epidemiologischen Nachbeobachtung bestätigt werden (Takai *et al.*, 2005). Insgesamt konnte das 6-Jahresüberleben im Vergleich zur Plazebo-Kontrollgruppe von 46% auf 74% gesteigert werden.

1.3 Die Regulation der Apoptose

Die Apoptose beschreibt das koordinierte Absterben der Zelle. Sie ist ein wesentlicher Prozess der Gewebemöostase. Zellneubildung und Zelltod stehen im Gleichgewicht. Bei malignen Transformationen wie dem HCC ist dieses Gleichgewicht gestört. Der Apoptoseablauf ist beeinträchtigt und Zellen können verstärkt proliferieren. Verschiedene Regulationsmechanismen steuern den „programmierten Zelltod“ (**Abb. 1.3**).

1.3.1 Ablauf der Apoptose

Die gemeinsame Endstrecke der unterschiedlichen Apoptose-auslösenden Signalwege ist die Caspase-Aktivierung. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum Cystein enthalten und bestimmte Peptide nach der Aminosäure Aspartat spalten (**Cysteiny-Aspartasen**) (Chang und Yang, 2000). Mehr als 14 dieser Enzyme sind bekannt. Sie sind in Signalkaskaden angeordnet und werden durch Spaltung aktiviert. Die Caspasen der Apoptose lassen sich in Initiator- (2, 8, 9, 10) und Effektorcaspasen (3, 6, 7) einteilen. Letztere sind als „downstream“-Caspasen hierarchisch am weitesten terminal im Signalweg der Apoptose angesiedelt und vermitteln die Proteolyse der Zelle. Ihre zahlreichen Substrate sind Proteine, wie die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), DNA-Proteinkinase, Aktin- oder Intermediärfilamente. Zur Bestimmung der Apoptose können ihre Spaltprodukte gemessen werden (z.B. cleaved PARP).

Abhängig von Zelltyp und Auslöser sind drei verschiedene Signalwege der Apoptoseinduktion bekannt. Sie kommunizieren über Quervernetzungen miteinander und sind nicht streng getrennt (**Abb. 1.3**).

Der **extrinsische Typ I-Weg** verläuft rezeptorvermittelt. Durch Bindung von Liganden wie TNF, Fas (CD95, APO-1) – Ligand oder TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand), kommt es zur Ausbildung des multimeren Komplexes DISC (**d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex) (Ashkenazi und Dixit, 1998). Dies führt schließlich zur Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 10.

Das Fas/ CD95/ APO-1 -System ist ein gut charakterisiertes Todesrezeptormodell. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Annäherung zwischen der zytoplasmatischen Todesdomäne DD (**d**eath **d**omain) und dem Adapterprotein FADD (**F**as **a**ssociated **d**eath **d**omain) (Walczak und Krammer, 2000). Dieses verbindet sich über seine DED (**d**eath **e**ffector **d**omain) mit der analogen Domäne der Procaspase 8. Der Komplex aus DD, FADD und Procaspase 8 bildet den DISC. Die Initiatorcaspase 8 aktiviert die Proteolysekaskade. Über ein weiteres Protein (Bid) kann der extrinsische Signalweg den mitochondrialen Apoptoseweg initiieren und damit den Prozess der Apoptose amplifizieren (Roy und Nicholson, 2000).

Der **intrinsische Typ II-Weg** ist der rezeptorunabhängige Signaltransduktionsweg. Die Mitochondrien spielen hierbei eine zentrale Rolle (Green, 2000). Bei der Aktivierung öffnen sich die Membranporen der äußeren Mitochondrienmembran und setzen pro-apoptotische Faktoren wie das Cytochrom C ins Zytoplasma frei. Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie, der Transkriptionsfaktor p53 und eine Vielzahl weiterer Proteine kontrollieren die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran. Im Zytoplasma bindet Cytochrom C an Apaf-1 (**a**poptosis **p**rotease **a**ctivating **f**actor). Mit der Procaspase 9 bilden sie einen Komplex, der Apoptosom genannt wird. Zusammen mit dATP (desoxy ATP) wird die Caspase 9 aktiviert, was die Induktion der Effektorcaspasen zur Folge hat.

Ein **dritter**, durch Stress ausgelöster Signalweg ist identifiziert (Nakagawa *et al.*, 2000). Dabei wird Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und die Caspase 12 aktiviert.

1.3.2 Apoptose-assoziierte Proteinkinasen

Auf den kontrollierten Ablauf der Apoptose nehmen unterschiedliche Regulatoren Einfluss. Zu diesen Mediatoren gehören die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Sie haben großen Anteil an der Signaltransduktion in zellulären Programmen, wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod.

Die Membran-Kern-Transduktionskaskade ist hierarchisch geordnet (**Abb. 1.2**). Nach einem Stimulus von Wachstumsfaktoren, Mitogenen oder Zytokinen werden zunächst über Oberflächenrezeptoren und GTP-bindende Proteine die MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (z.B. Raf, MLK3, MEKK1/4) induziert. Diese phosphorylieren die MAP-Kinase-Kinasen (MEK1/2 und MKK3/6/4/7), welche schließlich die MAP-Kinasen aktivieren (Chang und Karin, 2001).

Zahlreiche Substrate sind für die MAPK beschrieben worden. Sie können in den Zellkern übertreten und mit Transkriptionsfaktoren interagieren. Über Aktivierung von p62 (Elk1), c-myc, ATF2 oder AP-1 kontrollieren sie direkt die Expression verschiedener Gene (Huynh *et al.*, 2003). MAPK sind beteiligt am nukleären Transport und der Nukleosomenanordnung. Sie phosphorylieren Proteine im Zytoplasma und nehmen Einfluss auf die Regulation des Zytoskeletts.

Die MAPK werden in drei Subfamilien unterteilt: Extrazellulär-regulierte Kinasen (ERK1/2 oder p44/42MAPK), c-jun-N-terminale Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinasen (JNK/SAPK) und p38/high osmolarity glycerol Kinasen (p38/HOG-Kinasen). Sie zeigen unterschiedliche biologische Reaktionen.

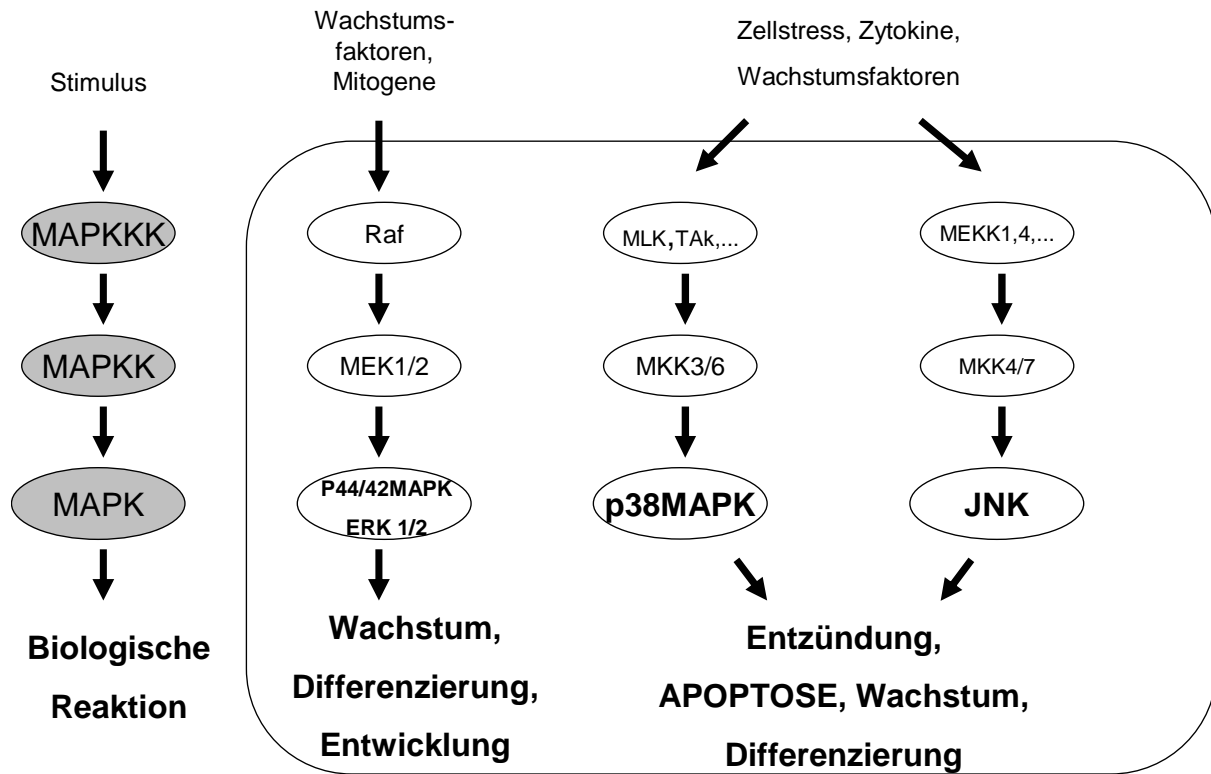


Abb. 1.2: Die vereinfachte Darstellung der MAPK-Kaskade und die Beteiligung an der Regulation von Prozessen in der Zelle.

JNK und p38 werden vor allem durch zellulären Stress aktiviert und zeigen eine Beteiligung an Entzündungs-, Differenzierungs-, Proliferations- und Apoptoseprozessen (Chang und Karin, 2001). Die Regulation ist abhängig von der jeweiligen Zellsituation. Eine gesteigerte JNK Expression wurde bei Fas- und Stress-induzierter Apoptose nachgewiesen. Die aktivierte MAPK phosphoryliert unter anderem Transkriptionsfaktoren wie c-fos und c-jun, welche den Komplex AP-1 bilden (Davis, 2000). Die gesteigerte c-Jun Synthese amplifiziert über eine verstärkte Cytochrom-C-Freisetzung den mitochondrialen Apoptoseweg. Im Gegensatz kann UV-Strahlung ohne Genexpression Apoptose induzieren (Tournier *et al.*, 2000). Diese Feststellung führte zur Annahme, dass JNK auch unabhängig von der Transkription in die Apoptoseregulation eingreift.

Auch die p38MAPK ist beteiligt an der Regulation des mitochondrialen Apoptosewegs. In humanen HCC-Zelllinien wurde eine stark verminderte Expression festgestellt (Iyoda *et al.*, 2003). Induktion der p38-MAP-Kinase in HepG2- und HuH7-

Zelllinien durch Transfektion von MKK6 führte zu einer gesteigerten Caspase 3 - Aktivität.

Dagegen führt die Induktion von p44/42 in vielen Zellen zu Wachstum und Differenzierung. In verschiedenen Karzinomzelllinien wurde eine verstärkte p44/42-MAP-Kinase-Aktivität gemessen, und auch in HCC-Zelllinien zeigte sich eine gesteigerte Expression (Huynh *et al.*, 2003). Der p44/42MAPK-Signalweg wird in erster Linie durch Wachstumsfaktoren induziert. Spezifische Inhibition dieser Kinase kann die Apoptoserate steigern. P44/42 ist demnach eine Onkogenese-assoziierte Kinase und nimmt eine antagonistische Rolle zu JNK und p38 ein (Xia *et al.*, 1995).

Ein weiterer Mediator der Apoptose ist die Proteinkinase B/AKT. Diese Serin-Threonin-Kinase nimmt die zentrale Rolle im *Survival*-Signalweg ein und zeigt eine anti-apoptotische Wirkung (**Abb. 1.3**).

Über Oberflächenrezeptoren wird die Bildung von AKT gesteuert. Wachstumsfaktoren induzieren durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) den second messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3). Das führt zu Aktivierung der 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1 (PDK1), welche schließlich inaktives AKT phosphoryliert (Nicholson und Anderson, 2002). Der Tumorsuppressor PTEN inhibiert die AKT-Bildung durch Dephosphorylierung von PIP3.

AKT inhibiert den intrinsischen Apoptoseweg über eine Hemmung der Freisetzung des Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Es inaktiviert die Forkhead Transkriptionsfaktoren, die vor allem Fas-Liganden induzieren können. Weitere proapoptotische Faktoren, wie BAD und Pro-Caspase 9 werden gehemmt. Phosphorylierung der I κ B-Kinase führt zu Aktivierung von NF κ B, was eine gesteigerte Transkription anti-apoptotischer Gene zur Folge hat (Testa und Bellacosa, 2001). AKT kann weiterhin durch Inhibition von p27 und p21 den Cyclin D abhängigen Eintritt in den Zellzyklus gewährleisten (Zhou *et al.*, 2001). Der p53-Inhibitor Mdm2 bildet mit inaktivem AKT einen Komplex. Wird AKT induziert, dissoziiert Mdm2 von seinem Bindungspartner. Der Inhibitor transloziert in den Zellkern und interagiert mit p53 (Mayo und Donner, 2001).

Aktivierung des *Survival*-Signalwegs über die Proteinkinase B führt zur Zellzyklusprogression und Inhibition der Apoptose. AKT wird in vielen Karzinomen überexprimiert und spielt eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese (Testa und

Bellacosa, 2001). Eine Hemmung dieser Kinase führt zu einer gesteigerten Apoptose. Inhibition von AKT wird auch als Wirkmechanismus der Retinolsäure diskutiert.

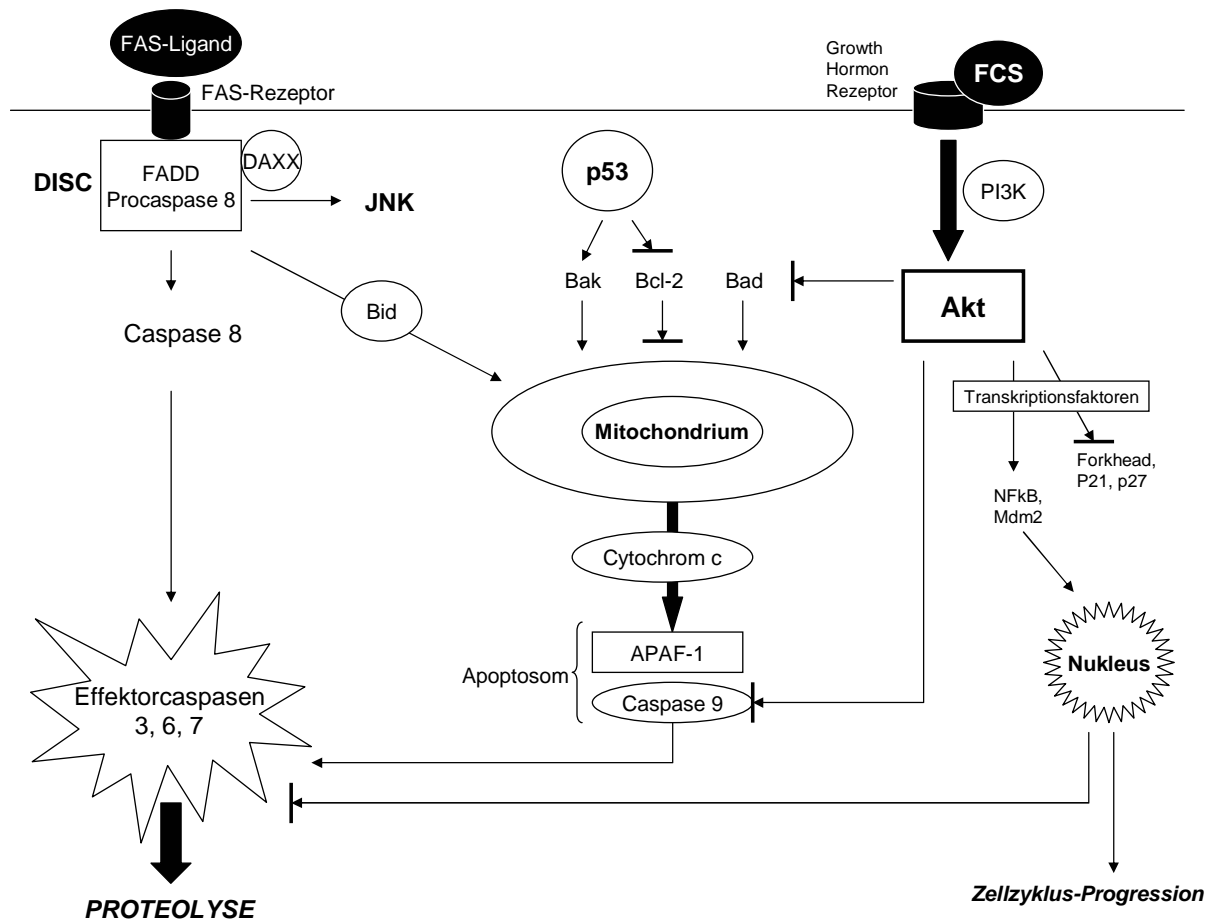


Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung der untersuchten Signalwege der Apoptoseregulation: Der Fas/ CD95/ APO-1 -Ligand aktiviert rezeptorvermittelt über den DISC-Komplex die Initiatorcaspase 8. Es folgt die Induktion der Effektorcaspasen, die die Proteolyse der Zelle vermitteln. Der mitochondriale Signaltransduktionsweg wird unter anderem durch die Bcl-Familie kontrolliert und steht unter dem Einfluss verschiedener Regulatoren (z.B. p53). Nach Freisetzung von Cytochrom C kommt es zur Apoptosom-Ausbildung und damit ebenfalls zur Induktion der Proteolysekaskade. Das Bid Protein verbindet den extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg. Aktivierung von AKT durch Wachstumsfaktoren kann die Apoptose auf unterschiedlichen Wegen (z.B. transkriptionelle Regelung oder Inhibition von Bad) inhibieren und den Eintritt in den Zellzyklus gewährleisten.

1.4 Vorkommen und Funktion von Cytokeratinen

1.4.1 Aufbau und Verteilung von Intermediärfilamenten

Das Zytoskelett der Eukaryontenzelle wird aus den fibrillären Proteinen der Mikrotubuli, Mikrofilamente und Intermediärfilamente gebildet. Sie erfüllen vielfältige Aufgaben wie Formgebung, Kontraktilität, intrazellulärer Transport und Ausbildung der Kernteilungsspindel. Aufgebaut sind sie jeweils aus charakteristischen Protein-Untereinheiten. Mikrotubuli bestehen aus Tubulin, Mikrofilamente aus Aktin und Intermediärfilamente aus verschiedenartigen Proteinen.

Die Intermediärfilamente bilden in ihrer polymeren Form unverzweigte Filamente von etwa 10nm Dicke. Im Gegensatz zu den anderen Zytoskelettkomponenten haben diese einen nicht-polaren Aufbau und sind schwer löslich. Sie werden in fünf Typen eingeteilt (Fuchs und Cleveland, 1998). Die Typ I und II Cytokeratine stellen dabei die größte Untergruppe dar. Sie kommen ausschließlich epithelial und in Haaren vor. Typ III Intermediärfilamente sind Vimentin, Desmin, GFAP (**g**lial **f**ibrillary **a**cidic **p**rotein) und Peripherin. Neurofilamente wie NF-L bilden den Typ IV. Die nukleären Lamine repräsentieren den Typ V. Phakinin und Filensin sind Bestandteile der Linse und bleiben ohne weitere Einteilung.

Der Typ I umfasst die sauren Keratine 9-23 und der Typ II die basisch bis neutralen Keratine 1-8. Beide bilden zusammen obligate, nichtkovalente Heteropolymere, die gewebsspezifisch exprimiert werden. Suprabasale Zellen im Ösophagus und in der Haut zeigen eine CK4/13 und CK1/10 Verteilung. Basale Keratinozyten exprimieren dagegen das CK-Paar 5/14. In einschichtigen Epithelien wie im Darm-, Pankreas- und Lebergewebe werden Kombinationen zwischen CK7, CK8, CK18, CK19 und CK20 gefunden. Hepatozyten exprimieren in der Regel das CK-Paar 8/18 (Fuchs und Cleveland, 1998).

Da die gewebsspezifische Verteilung der Cytokeratinpaare auch in undifferenzierten Karzinomen lange erhalten bleibt (Herzig *et al.*, 1994), kann ihre Analyse zur Diagnostik genutzt werden. Immunhistochemisch lässt sich in den Zellen des hepatozellulären Karzinoms das CK-Paar 8/18 nachweisen.

Cytokeratine sind aufgebaut durch eine zentrale α -Helix-(Rod)-Domäne (Fuchs und Cleveland, 1998). Diese besteht aus zwei umwundenen Polypeptid- α -Helices. Sie wird durch kurze Linker-Regionen unterbrochen und von variablen NH₂- (Head) und COOH- (Tail) Domänen flankiert, welche den Strukturhalt der Keratine gewährleisten (**Abb. 1.4**). CK18 wird aus 429 Aminosäuren gebildet. Die Stelle Asp237 befindet sich in der Linkerregion 1-2. Sie stellt bei verschiedenen Intermediärfilamenten die Spaltungsstelle für die Caspasen dar (Ku *et al.*, 1997).

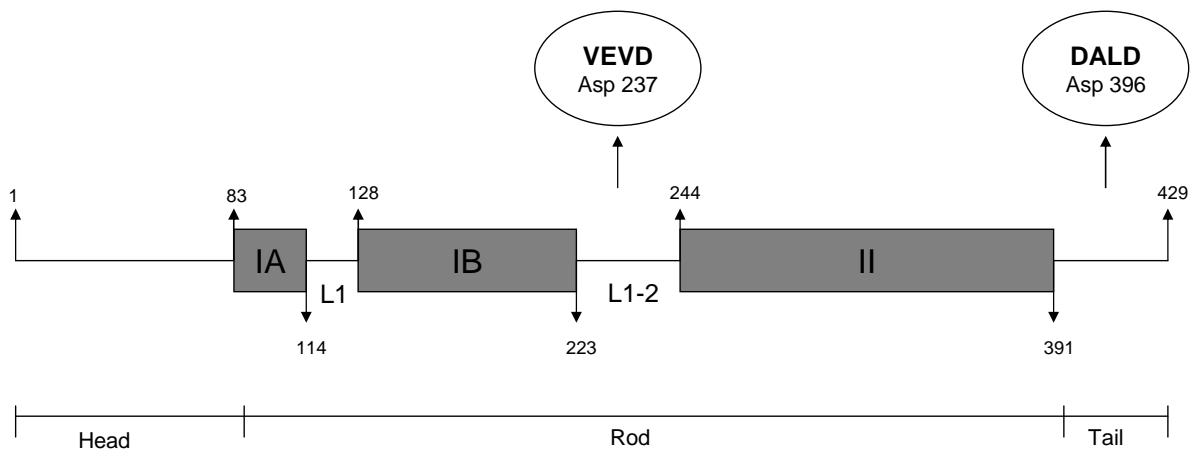


Abb. 1.4: Schematische Skizze von CK18. Dargestellt ist die α -Helix (= Rod-Domäne) als Aminosäuresequenz, die von der N-terminalen Head- und C-terminalen Tail-Domäne flankiert wird. Durch Linkerregionen wird der Rod-Teil in weitere Subdomänen unterteilt. In der Apoptose spalten die Effektorcaspasen 3,6 und 7 das CK18 zunächst an dem DALD-Motiv im Tail-Bereich und danach an dem VEVD-Motiv in der Linkerregion 1-2.

Die Organisation und Löslichkeit der Cytokeratine sowie die Spaltung von Typ I Keratinen in der Apoptose, wird über die Phosphorylierung kontrolliert. Der Abbau zellulärer Komponenten muss reguliert ablaufen, um überschießende Immunreaktionen zu verhindern. Apoptoseinduktion führt zur Phosphorylierung von CK18 an Ser53 und zu einer Umverteilung von CK8/18 (Coulombe und Omary 2002). Mutationen in diesem Bereich können den Ablauf der Apoptose beeinflussen. Durch Caspase-Aktivität kommt es zur Spaltung von CK18 (Caulin *et al.*, 1997). CK8 wird nicht fragmentiert. An zwei bekannten Stellen wird CK18 durch die Caspasen gespalten: Das DALD- und das VEVD- Motiv bietet die Spaltungsstellen der

Aspartasen (Ku *et al.*, 1997). DALD liegt im Tail-Bereich an der Stelle Asp396. In der Rod-Domäne ist VEVD bei der Linker Region 1-2 an der Stelle Asp237 zu finden (**Abb. 1.4**).

Durch Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 kommt es in der Apoptose zur CK18- Spaltung. Dabei spalten die Caspasen 3 und 7 vor allem im DALD-Motiv und Caspase 6 im VEVD-Motiv (Ku *et al.*, 1997).

1.4.2 Die Funktion der Cytokeratine

Die flankierenden „Head“- und „Tail“-Domänen der Cytokeratine sind die Orte der post-translationalen Modifizierung. Durch Phosphorylierung, Glycosylierung, Transglutaminierung und Farnesylierung werden die Funktionen der Intermediärfilamente reguliert (Omary *et al.*, 2004).

So ist Ser73 von CK8 und CK19 eine physiologische Phosphorylierungsstelle der p38MAPK und bedeutend für die Reorganisation der Cytokeratine. Während der Mitose und nach Stimulierung mit dem epidermalen Wachstumsfaktor kommt es zur gesteigerten Phosphorylierung von CK8 an Ser431. Hyperphosphorylierung von CK8 scheint vor Ubiquitinierung zu schützen (Ku und Omary, 2000). CK8/18-Hyperphosphorylierung wurde bei der Leberzirrhose nachgewiesen und diente als Marker für eine Progression der Lebererkrankung (Toivola *et al.*, 2004).

Cytokeratin-Defekte sind assoziiert mit Hepatopathien: Mutationen von CK8/18 wurden bei Zirrhosepatienten nachgewiesen (Ku *et al.*, 2003a, 2005). Dabei sollen diese Veränderungen zur Entstehung von Lebererkrankungen prädisponieren. Sie sind Risikofaktoren für die Entwicklung einer kryptogenen Zirrhose. Weiterhin wird angenommen, dass verschiedene CK8-Varianten mit der Genese einer chronischen Pankreatitis im Zusammenhang stehen (Cavestro *et al.*, 2003).

Cytokeratine interagieren mit unterschiedlichen Proteinen. Sie sind assoziiert mit Strukturproteinen, die der Vernetzung des Zytoskeletts dienen. Es lassen sich jedoch ebenfalls Interaktionen mit Chaperonen, Kinasen, apoptosespezifischen und nukleären Proteinen nachweisen, die in Regulationsmechanismen der Zelle

eingreifen (Omary *et al.*, 2004). Speziell für die Cytokeratine wird bei zellulären Abläufen eine regulierende Funktion vermutet (Omary *et al.*, 2002).

Anderson *et al.* (1996) wiesen in mehreren Zelllinien nach, dass die Cytokeratinexpression einen Einfluss auf die Zytostatika-Resistenz vermitteln konnte. Einige Zytostatika wirken über rezeptorvermittelte Apoptose. Cytokeratinmutationen können TNF-induzierte Apoptose abschwächen (Caulin *et al.*, 2000). Verschiedene CK8/18-defiziente Zelllinien reagieren sensitiver auf Apoptosereize durch TNF- und Cyclohexamidstimulation als die Cytokeratin ausbildende Kontrollgruppe. Zellen, die kein CK8/18 exprimieren, zeigen dabei eine erhöhte NFκB und JNK Aktivierung. Es wird eine Bindung von CK18 mit TRADD (TNF-R1 associated death domain protein) beschrieben (Inada *et al.*, 2001). Dieses Protein bildet mit dem TNF-Rezeptor einen Komplex, der die Caspase 8 aktiviert. Es wird vermutet, dass CK18 durch eine Komplexbildung mit TRADD Apoptose inhibiert.

Weiterhin haben Cytokeratine einen regulierenden Einfluss auf die Fas-induzierte Apoptose. CK8 defiziente Hepatozyten der Maus reagieren sensitiver auf Fas-Stimulation als der Wildtyp (Gilbert *et al.*, 2001). Zellen ohne CK8 weisen dabei eine geringere Fas-Rezeptordichte auf. Möglicherweise schränken die Cytokeratine den Transport einiger Proteine vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche ein. Auch CK18 Mutationen in Hepatozyten erleichtern eine Fas-induzierte Apoptose (Ku *et al.*, 2003b).

Damit hat sich das Verständnis über die Funktion der Intermediärfilamente gewandelt. Die Bedeutung der Cytokeratine geht über den Erhalt der mechanischen Stabilität hinaus. Sie haben nicht nur die Aufgaben eines Strukturproteins. Die Cytokeratine erfüllen zudem den Anspruch eines Funktionsproteins. Die komplexen Proteininteraktionen, die post-translationale Modifikation und die Assoziation mit verschiedenen Krankheitsbildern lassen eine Rolle in Regulationsmechanismen der Zelle vermuten.

1.5 Das ZAP90 Protein

In der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 konnte durch die Immunfluoreszenz eine Co-Lokalisation von CK18 und dem ZAP90-Protein nachgewiesen werden (Vollbrecht, 2002). Während aller Zellzyklusphasen zeigte sich eine Anfärbbarkeit retikulärer Strukturen. Das ZAP90 Protein gehört zu einer neuen Familie proliferationsassoziiierter Proteine (ZAP 52, ZAP82, ZAP87, ZAP90, ZAP111). Die ZAP Gene wurden mittels Differential-Display-RT-PCR Methode aus einer humanen Pankreaszelllinie isoliert und die Proteinstruktur wurde charakterisiert (Günther *et al.*, 1999).

ZAP90 war in Gewebsschnitten humaner Pankreasadenokarzinome vermehrt anfärbbar. In Pankreaskarzinomzellen konnte ZAP90-mRNA durch Reverse Transkription detektiert werden, nicht jedoch in gesundem Pankreasgewebe (Zill, 2000). Eine Überexpression von ZAP90-GFP in CHO-Zellen führte zu Größenzunahme und Kernpolymorphie (Vollbrecht, 2002).

1.5.1 Die Proteinstrukturmotive

Die Proteine zeigen kennzeichnende Struktur motive (**Abb. 1.5**): Zinkfinger, Ankyrin-Repeats und Plekstrin-Homologien (**ZAP**). Die Namensgebung leitet sich aus den Anfangsbuchstaben dieser konservierten Domänen und dem Molekulargewicht in Kilo-Dalton ab.

Zinkfinger-Domänen sind Sekundärstrukturen, die bei vielen DNA/RNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und Hormonrezeptoren vorkommen. Weiterhin scheinen sie eine bedeutende Rolle bei Protein-Interaktionen zu spielen. Zinkfinger sind z.B. wichtig für die Proteinbindungen der Raf1-Kinase und der Proteinkinase C (MacKay und Crossley, 1998). Bei der ZAP-Familie handelt es sich um einen C4- Zinkfinger.

Ankyrin ist ein Strukturprotein. Bei den Erythrozyten dient es der Brückenbildung zwischen Spektrin und membranständigen Proteinen. Die Ankyrin-Repeat-Domänen sind Moleküle aus 33 repetitiven Aminosäuren, die eine Komplexbildung zweier Proteine vermitteln können. Diese Domänen wurden z.B. bei dem p53-bindenden Protein 53BP2 nachgewiesen (Gorina und Pavletich, 1996).

Die Pleckstrinhomologie-Domäne ist in dem Proteinkinase C -Substrat Pleckstrin entdeckt und beschrieben worden (Hemmings, 1997). Die Pleckstrinhomologien (PH) bilden als dreidimensionale Struktur eine hydrophobe Tasche. Damit dienen sie der Translokation, Konformationsänderung oder Interaktion von Proteinen. Die PH-Domäne ist v.a. wichtig bei der Bindung von Phosphatidylinositolphosphaten (PIP). Verschiedene Signaltransduktionskaskaden werden auf diese Weise reguliert.

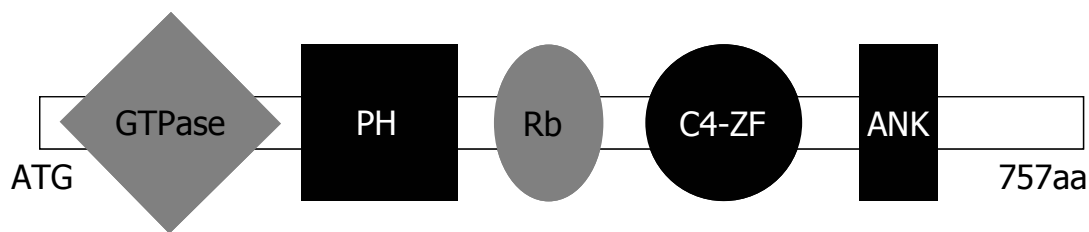


Abb. 1.5: Schematische Proteinstruktur von ZAP90 mit seinen Strukturelementen:
GTPase = potentielle GTPase Domäne, PH = Pleckstrinhomologie Sequenz, Rb = pRb-Bindungsstelle = LXCXE-Motiv, ZF = Zinkfinger, ANK = Ankyrin Repeat.

1.5.2 Die ZAP90-Genregulation

Das ZAP90-Gen ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert. Der entsprechende Locus 12q13.3 liegt neben streng regulierten Genen wie dem p53-Inhibitor Mdm2 und der Zellzykluskinase CDK4. Diese Region wird verstärkt in Neuroblastomen und Sarkomen coamplifiziert.

Die 6120 bp lange Promotorregion weist verschiedene Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren auf (**Abb. 1.6**). Wichtige Regulatoren wie NFκB, p300/CREB, STAT und elk/ets können hier interagieren. Die Transkription wird unter anderem durch die MAP-Kinasen reguliert (Zill, 2000): Stimulierung der p44/42-MAP-Kinase führte zur Aktivitätssteigerung des Promotors. Weiterhin wurde eine MAR (**m**atrix **a**ssociated **r**egion) identifiziert. Diese Sequenz ist für eine Bindung der DNA an Histone verantwortlich und nur in stark regulierten Genen nachzuweisen.

Die Transkription des ZAP90-Gens erfolgte in den hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 und Hep3B zellzyklusabhängig (Vollbrecht, 2002). Während der Mitose kam es zu einer gesteigerten Aktivierung des Promotors.

Zudem zeigte ZAP90 in der Immunfluoreszenz bei der Mitose-Arretierung durch Nocodazol-Inkubation eine verstärkte Anfärbbarkeit. Überexpression von Wildtyp p53 führte zu einer Hemmung der Gentranskription (Zill, 2000). Dagegen steigerte mutiertes p53 die ZAP90-Promotoraktivität.

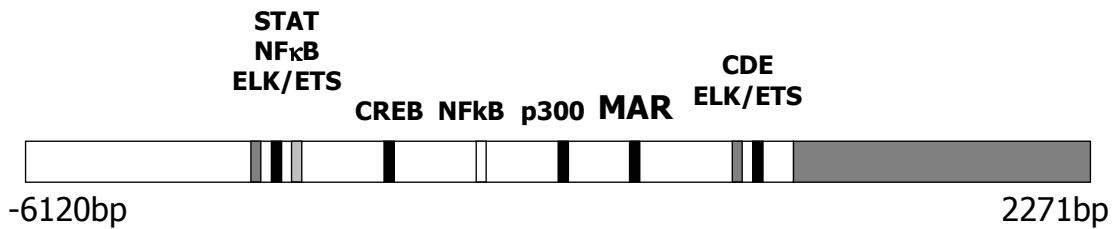


Abb. 1.6: Der ZAP90-Promotor mit seinen potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

1.5.3 Die mögliche Funktion von ZAP90

Neben der CK18 Co-Lokalisation ließen sich in Yeast-Two-Hybrid Experimenten auch andere Proteinbindungspartner von ZAP90 nachweisen (Maßmann, 2000): das Daxx-Protein, die L-Serin-Dehydratase und die Ribonukleotid-Reduktase. Die Interaktion zwischen ZAP90 und dem humanen Daxx scheint besonders interessant.

Daxx wird eine Rolle in der Regulation wichtiger Signalwege wie Apoptose und Transkription zugesprochen. Die genaue Funktion des Proteins bei der Apoptose wird kontrovers diskutiert.

Initial wurde Daxx als Bindungsprotein der zytosolischen Domäne des Fas-Rezeptors beschrieben (Yang *et al.* 1997). Eine Bindung und Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase Ask1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Chang *et al.*, 1998). Ask1 aktiviert JNK und induziert dadurch Apoptose. Daxx interagiert aber auch direkt mit JNK und kann dadurch proapoptotische Effekte ausüben (Laloti *et al.*, 2009). Eine Apoptosevermittlung wurde für Daxx zudem über die Bindung an den TGF-β-Rezeptor nachgewiesen (Perlman *et al.*, 2001).

Andererseits führte die homozygote Deletion des Daxx-Gens bei Mäusen zu erhöhter embryonaler Letalität und deutlich gesteigerter Apoptoserate (Michaelson *et al.*,

1999). Chen *et al.* (2003) konnten mittels siRNA Versuchen die Daxx-Translation inhibieren. Die verminderte Daxx-Expression allein zeigte kaum einen Effekt. Allerdings konnte durch Fas-Stimulation und Stressreize verstärkt Apoptose ausgelöst werden.

Die Funktion von Daxx in der Apoptose ist noch nicht genau geklärt. Die Interaktion von ZAP90 und Daxx könnte ein Hinweis darauf sein, dass ZAP90 selbst an regulatorischen Prozessen in der Apoptose beteiligt ist. Der Gebrauch von Stützproteinen zur Kontrolle der Apoptose konnte durch JIP-1 (JNK interacting protein1) bereits verdeutlicht werden (Dickens *et al.*, 1997): Überexpression von JIP-1 führte zur Retention der MAP-Kinase JNK. Dabei wird durch die Bindung von JNK der Signalweg unterbrochen und eine Apoptoseinduktion inhibiert. Auch für Daxx wurde kürzlich eine mikrotubuli-assoziierte Bindung an JNK nachgewiesen, die eine regulatorische Funktion von Stützproteinen vermuten lässt (Laloti *et al.*, 2009).

Die Proteininteraktionen und die zellzyklusabhängige Transkriptionskontrolle machen eine Beteiligung von ZAP90 an Regulationsmechanismen der Zelle, wie Proliferation und Apoptose, wahrscheinlich. Die Assoziation mit dem CK18 lässt die Rolle des Proteins im Sinne einer so genannten „scaffold function“ (Günther *et al.*, 1999) erscheinen, bei der durch strukturelle Proteininteraktionen bestimmte Signaltransduktionen vermittelt werden.

1.6 Ziel der Arbeit

Die hohe Sterblichkeit und die geringe Überlebenszeit des hepatozellulären Karzinoms sind bedingt durch unzureichende diagnostische Verfahren zur Früherkennung und die eingeschränkten Therapiemöglichkeiten. Erkenntnisse über molekulare Mechanismen erscheinen daher von besonderem Interesse.

Retinoide werden als mögliche Therapieoption für das hepatozelluläre Karzinom vermutet. Um die zu Grunde liegenden biochemischen Mechanismen besser zu verstehen, sollte die Wirkung von all-trans RA und 9-cis RA auf hepatozelluläre

Karzinomzelllinien geprüft werden. Ziel der Arbeit war unter anderem die Untersuchung der Retinolsäure-induzierten Apoptose in den humanen Zelllinien HepG2 und Hep3B. Die Western-Blot Analyse der beteiligten Signaltransduktionswege sollte die Wirkweise der Retinoide veranschaulichen.

Die gewebsspezifische Expression bestimmter Cytokeratinpaare ermöglicht den Einsatz in der Diagnostik undifferenzierter Karzinome. Weiterhin lässt der angesprochene Wandel über das Verständnis der Cytokeratine eine Beteiligung an zellulären Regulationsmechanismen als wahrscheinlich erscheinen. Vor diesem Hintergrund sollte die CK18-Expression in hepatozellulären Karzinomzelllinien sowie das Verhalten während der Apoptose durch die Immunfluoreszenzhistologie und im Western-Blot analysiert werden.

Eine Verifizierung der Co-Lokalisation von CK18 und ZAP90 war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Die beschriebenen Proteininteraktionen lassen eine Funktion für ZAP90 innerhalb von Signaltransduktionskaskaden vermuten. Daher sollte die Co-Lokalisation mit CK18 und das Verhalten von ZAP90 in der Apoptose bei hepatozellulären Karzinomzelllinien immunhistochemisch verfolgt werden, um Rückschlüsse auf die mögliche Funktion in der Hepatokarzinogenese zu erzielen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)	Biomol
6-Aminocapronsäure	Sigma Chemical Company
Aceton	MERCK
Ammoniumperoxodisulfat (AMPS)	MERCK
Biotinylierter MW Standard	New England Biolabs
bis Benzimide (Hoechst Nr. 33258)	Hoechst
BME-Amino Acids Solution (50x)	Sigma Chemical Company
BSA	Biomol
Coomassie brilliant blue G250	Biomol
Coomassie brilliant blue R250	Biomol
DMSO	Sigma Chemical Company
EDTA	MERCK
Essigsäure 100%	MERCK
Ethanol absolut	MERCK
FCS	Biochrom KG
Fluorsave™ Reagent	Calbiochem
Glycin	Sigma Chemical Company
HCl 25%	MERCK
Isopropanol	MERCK
KCl	MERCK
L-Glutamin	PAA-Laboratories
LumiGlo Reagent and Peroxide	Cell Signaling Technology
LY 294002	Calbiochem
Magermilchpulver	Roth
MEM-EARLE	PAA-Laboratories
Methanol	MERCK
Na-Acetat	Sigma Chemical Company
NaCl	MERCK

Na-Pyruvat 100 mM	PAA-Laboratories
Paraformaldehyd 20%	Sigma Chemical Company
PBS	PAA-Laboratories
Retinolsäure: all-trans RA	Sigma Chemical Company
9-cis RA	Sigma Chemical Company
RPMI 1640	PAA-Laboratories
SDS	Biomol
SDS-Loading Buffer (3x)	New England Biolabs
TEMED	Sigma Chemical Company
Thymidin	Sigma Chemical Company
TPA (Tetradecanoylphorbolacetat)	Biomol
Tris base	Biomol
Trypsin-EDTA-Solution (10x)	PAA-Laboratories
Tween-20	Sigma Chemical Company

2.1.2 Kit

SignalSilence™ AKT siRNA KIT	Cell Signaling Technology
------------------------------	---------------------------

2.1.3 Antikörper

3c	I. Medizin, UK-SH, Campus Kiel
Anti-Fas (CD95/APO-1)	Roche
AKT	Cell Signaling Technology
phAKT	Cell Signaling Technology
Cytokeratin 18, DC-10	Santa Cruz Biotechnology
cIPARP	Cell Signaling Technology
M30 CytoDeath® Fluorescein	Roche
p44/42	Cell Signaling Technology
ph p44/42	Cell Signaling Technology
anti-mouse-FITC	Dianova
anti-mouse-TRITC	Dianova

anti-rabbit-HRP	Cell Signaling Technology
anti-mouse-HRP	Cell Signaling Technology
anti-biotin-HRP	Cell Signaling Technology
anti-rabbit-IgG-Biotin	Sigma Immuno Chemicals

2.1.4 Puffer und Lösungen

SDS Elektrophorese-Puffer	Tris base	15,1 g
	Glycin	720 g
	SDS	5,0 g
	ad 1l dH ₂ O	
SDS-Sammelgel	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	325 µl
	4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	625 µl
	dH ₂ O	1,5 ml
	AMPS (10%)	13,5 µl
	TEMED	2,5 µl
SDS-Separating Gel	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	10 ml
	4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	7,5 ml
	dH ₂ O	12,5 ml
	AMPS (10%)	110 µl
	TEMED	22 µl
TBS (10x) für Western-Blot	Tris base	24,2 g
	NaCl	80,0 g
	ad 1l dH ₂ O; pH 7,6	
TBS (20x) für Immunfluoreszenz	Tris base	60,0 g
	NaCl	160,0 g
	KCl	4,0 g
	ad 1l dH ₂ O; pH 7,4	

TBS-T	TBS (10x)	100 ml
	Tween-20	1 ml
	ad 1l dH ₂ O	
Tris-Cl/SDS (4x)	Tris base	1,5 M
	SDS	0,4%
	pH 8,8 bzw. 6,8 (filtriert)	
Western-Blot Antikörperlösung 1	TBS (1x)	10 ml
	BSA	0,5 g
	Tween-20	10 µl
	primärer AK	10 µl
Western-Blot Antikörperlösung 2	Blockierungslösung	10 ml
	HRP-anti-rabbit/mouse-AK	10 µl
	HRP-anti-biotin-AK	10 µl
Western-Blot Blockierungslösung	TBS (1x)	50 ml
	Magermilchpulver	2,5 g
	Tween-20	50 µl
Western-Blot Detektionslösung	dH ₂ O	7,2 ml
	LumiGlo Reagent A (20x)	400 µl
	Peroxidase Reagent B (20x)	400 µl
SDS-Gel Färbelösung	Coomassie brilliant blue R250	2 g
	Coomassie brilliant blue G250	0,5 g
	in 425ml Ethanol lösen	
	Methanol	50 ml
	Essigsäure	100 ml
	ad 1l dH ₂ O	

SDS-Gel Entfärbelösung I	Ethanol	450 ml
	Essigsäure	100 ml
	ad 1l dH ₂ O	
SDS-Gel Entfärbelösung II	Essigsäure	70 ml
	ad 1l dH ₂ O	
SDS-Gel Entfärbelösung III	Methanol	50 ml
	Essigsäure	76 ml
	ad 1l dH ₂ O	
Western-Blot Puffer I	Tris base	36,25 g
	Methanol	200 ml
	ad 1l dH ₂ O	
Western-Blot Puffer II	Tris base	3,03 g
	Methanol	200 ml
	ad 1l dH ₂ O	
Western-Blot Puffer III	Tris base	3,03 g
	Methanol	200 ml
	6-Aminocaprinsäure	40 mM
	ad 1l dH ₂ O	

2.1.5 Geräte

Autoklav	Gössner GVA 570
Blotkammer	Ancos Semis-Dry Electroblotter A
Brutschrank	Heraeus 0871-B
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Laborwaage	Sartorius CP124S-OLE
Magnetrührer	Jahnke und Kunkel Ikamag® RCT

Mini-Gelkammer	Biometra
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten	Labsystems 4500
Quecksilberlampe	Leistungselektronik Jena GmbH
Rotationsschüttler	Jahnke und Kunkel MS1 Minishaker
Spannungsquelle	Desaga Netzgerät 500/500
Tischzentrifuge	Heraeus Instruments Biofuge fresco
Wasserbad	GFL 1083
Zentrifuge	Heraeus Sepatech Varifuge 20 RS

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Stimulation

HepG2: Die humane Zelllinie HepG2 (Rb^{+/+}, p53^{+/+}) (ATCC-Nummer: HB-8065), isoliert aus dem Gewebe eines hepatozellulären Karzinoms, wurde in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 1% L-Glutamin bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Hep3B: Hep3B-Zellen (Rb^{-/-}, p53^{-/-}) (ATCC-Nummer: HB-8062), ebenfalls eine hepatozelluläre Karzinomzelllinie, wurden in MEM-EARLE Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% BME-Aminosäure und 1% Natrium-Pyruvat bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Bei einer Verdopplungszeit von etwa 50 Stunden wurden die Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-Lösung (Trypsin-EDTA, Gibco BRL, 5g/l Trypsin, 2g/l EDTA, 8,5g/l NaCl, in PBS) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in 50ml-Röhrchen überführt. Zur Neutralisation der Trypsinwirkung wurde ein Volumen Zellkulturmedium hinzugefügt und anschließend bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Resuspension mit frischem Medium wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:5 geteilt und auf neue Zellkulturflaschen mit je 12ml Medium verteilt.

Die Zellen wurden vor den Versuchen insgesamt 48 Stunden kultiviert. Dazu wurden sie auf 12-well-Platten mit je 1ml Medium verteilt. Die ersten 24 Stunden erhielten

beide Zelllinien ein Medium mit einem 10%igen FCS Anteil, so dass sie eine geeignete Zelldichte erreichten. Nach einem Mediumwechsel wurde für die nächsten 24 Stunden ein Nährmedium mit einem 0,5%igen FCS-Anteil eingesetzt. Die Zellen konnten nun direkt im Medium mit Retinolsäure, Anti-Fas, TPA und LY294002 stimuliert werden.

- Stimulation:

RA: Die Retinolsäure (RA) ist die aktive Wirkform der Retinoide. Es existieren die zwei Isoformen all-trans und 9-cis RA. In Zeit- und Konzentrationskinetikversuchen wurden beide zur Apoptoseinduktion eingesetzt. Die Zellen wurden bis zu 18h mit atRA (25µM - 200µM) und 9-cisRA (5µM - 100µM) der Firma SIGMA® inkubiert.

Anti-Fas: Monoklonaler Antikörper gegen Fas/CD95/APO-1 zur Induktion von Apoptose in Fas-Rezeptor tragenden Zellen der Firma Roche®. Eingesetzt wurde er in einer Konzentration von 0,5 µM/ml.

TPA: Der Phorbolester TPA (Tetradecanoylphorbolacetat) aktiviert die Proteinkinase C und führt zur Phosphorylierung der p44/42-MAP-Kinase. TPA der Firma BIOMOL® wurde in einer Konzentration von 0,1µg/ml eingesetzt.

Ly294002: Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)- Inhibitor zur Hemmung der AKT-Aktivierung. Ly294002 der Firma Calbiochem® wurde mit 50µM eingesetzt.

2.2.2 Western-Blot

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in Proben. Proteine eines Zelllysats werden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt und anschließend durch Blotten auf eine Polymermembran transferiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Enzym-gekoppelten Antikörper markiert. In der folgenden Enzym-

katalysierten Indikatorreaktion wird ein lumineszierendes Reaktionsprodukt gebildet, welches zur Abbildung des Blots auf einem Röntgenfilm genutzt wird.

- Versuchsprotokoll:

Nach Wachstum auf 12-well-Platten wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen, in 100µl Sample Buffer pro well (3xSDS Sample Buffer + 1/10 Vol. DTT, 1,25 mol) lysiert und in ein 1,5ml Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und, zur Minderung der Viskosität, kurz mit Ultraschall behandelt.

Für die Gelelektrophorese wurde ein diskontinuierliches Gel benutzt, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel besitzt größere Poren und einen niedrigeren pH-Wert. Darin wandern die Proteine schnell und ohne Auftrennung. Es dient dazu, die Proteine in einer scharfen Bande vor dem Trenngel zu sammeln, so dass alle Proben zur gleichen Zeit eintreten. Im Trenngel werden die Proteine abhängig von ihrer Molekülmasse getrennt.

Zum Gießen des Gels wurden die Glasplatten (Kantenlänge 10cm) mit Isopropanol gereinigt, ein Gummispacer aufgelegt, anschließend diese Glasplatten zusammengeklemmt und aufgestellt. Die Komponenten des Trenngels wurden zusammenpipettiert und bis 1cm unter den Rand eingefüllt. Überschichtet mit Isopropanol polymerisierte das Gel für 1 Stunde. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und mit destilliertem Wasser nachgespült. Auf das auspolymerisierte Trenngel wurde nun das Stacking Gel gegossen, in das der Gelkamm für die Geltaschen eingesteckt wurde. Nach 30-minütiger Polymerisierung wurde das Gel in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Pufferkammer gespannt, der Gelkamm entfernt und die Geltaschen mit SDS-Laufpuffer ausgespült. Je Probe wurden zwischen 2-10µl aufgetragen und in eine Geltasche 2µl biotinylierter Standard gegeben. Bei 30mA liefen die Proben zunächst durch das Stacking Gel. Nach Eintritt in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 40mA erhöht.

Um quantitative Aussagen im Western-Blot zu erreichen, müssen gleiche Proteinmengen aufgetragen werden. Hierzu wurden die Proteine im Trenngel direkt gefärbt und anhand der Stärke der Proteinbanden die einzusetzenden Mengen bestimmt.

Das Separating-Gel wurde zunächst für 30 Minuten bei 75°C in der Coomassie brilliant blue -Färbelösung inkubiert. Nach Verwerfen der Färbelösung wurde für 2 Minuten in Entfärber I, für 45 Minuten bei 75°C in Entfärber II und schließlich für 1h bei 75°C in Entfärber III gespült. Nun wurde das Gel auf einem Whatman-Paper, bedeckt mit Frischhaltefolie, bei 70°C für 1 Stunde im Gelrockner getrocknet und konnte beurteilt werden.

Nach neuerlicher Elektrophorese mit den angepassten Proteinmengen wurde zum Blotten der Proteine die Semi-dry-Methode angewendet. Auf einen Stapel aus 6 in Blot-Puffer I getränkter Whatman-Paper (6,5x9cm) wurden 3 in Blot-Puffer II getränkte Whatman-Paper passgenau aufgelegt, darauf wiederum die zuvor eine Minute in Methanol und anschließend in destilliertem Wasser gespülte Membran. Das Trenngel wurde aufgelegt und mit 6 weiteren, in Blot-Puffer III getränkten Whatman-Paper bedeckt. In der Blotkammer wurde anschließend für 1 Stunde bei 70mA geblottet.

Die Membran wurde zunächst für 5 Minuten in TBS gewaschen. Die freien Bindungsstellen wurden durch die Milchpulver-Blockierungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligem Waschen von jeweils 5 Minuten in TBS-T folgte die Inkubation mit der Antikörperlösung I über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für je 5 Minuten inkubierte die Antikörperlösung II (anti-Mouse HRP, anti-Rabbit HRP, Verdünnung 1:1000) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurde wiederum 3x5 Minuten in TBS-T gewaschen, die Membran für 1 Minute in der Detektionslösung inkubiert und zwischen zwei Frischhaltefolien auf einem Stück Pappe fixiert. Der Röntgenfilm wurde zwischen 10 Sekunden und 3 Minuten belichtet und automatisch entwickelt.

- Eingesetzte Antikörper:

Cytokeratin 18 (= DC-10) - monoklonaler muriner Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology® (Verdünnung nach Herstellerangaben 1:5000).

cIPARP – polyklonaler Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® gegen Asp214 (Verdünnung nach Herstellerangaben 1:1500) zur Messung der Apoptose.

AKT - polyklonaler Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® detektiert die Gesamtkonzentration von AKT (Verdünnung nach Herstellerangaben 1:1000).

phAKT - polyklonaler Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® gegen Phosphorylierung von AKT an Ser473 (Verdünnung nach Herstellerangaben 1:1000).

p44/42 MAPK - polyklonaler Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® bestimmt den Gesamtgehalt von p44/42 (Verdünnung nach Herstellerangaben 1:1000).

ph p44/42 MAPK - polyklonaler Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® gegen die aktivierte *ph p44/42* Form (Thr202/204) (Verdünnung nach Herstellerangaben 1:1000).

2.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz ermöglicht es, die intrazelluläre Verteilung und die Assoziation von Proteinen mikroskopisch zu untersuchen. Man kann qualitative Aussagen zur Lokalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten erzielen.

Durch einen spezifischen Antikörper werden die jeweiligen Proteine in fixierten Zellen markiert. Die gebundenen Antikörper werden wiederum durch sekundäre Antikörper erkannt, die an einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein oder Rhodamine) gekoppelt sind. Angeregt durch blaues Licht leuchtet Fluorescein im Fluoreszenzmikroskop grün, Rhodamine wird durch grün-gelbes Licht zu roter Fluoreszenz angeregt.

- Versuchsprotokoll:

Die Zellen wurden auf Deckgläschen (Ø 18mm) in 12-well-Platten kultiviert und stimuliert. Dann wurden sie 1 Minute lang in PBS gewaschen, für 5 Minuten in –20°C kaltem Methanol und anschließend für 2 Minuten in –20°C kaltem Aceton fixiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS für jeweils 10 Minuten folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Auf einer mit Parafilm® bezogenen Glasplatte wurden je 60µl Antikörperlösung aufgetropft und die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten aufgelegt. In einer feuchten Kammer wurde anschließend für 18 Stunden

bei +4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte wiederum nach dreimaligem Waschen in TBS für je 10 Minuten. Die fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper wurden in einer Konzentration von 0,05µg/ml in TBS eingesetzt. Gleichzeitig erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit dem Hoechst-Farbstoff bisBenzimide (2,5µg/ml in TBS) für die Auswertung im Zeiss-Fluoreszenzmikroskop. Nach 1-stündiger Inkubation in feuchter Kammer bei 37°C in Dunkelheit, folgte erneut ein Waschschrift in dreimal gewechseltem TBS für je 10 Minuten, ebenfalls im Dunkeln. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträgern auf je einen Tropfen FluorSave® luftblasenfrei aufgelegt und mit farblosem Nagellack rundherum versiegelt. Die Lagerung erfolgte bei +4°C in Dunkelheit.

Die Doppelfärbung eignet sich, um Rückschlüsse auf eine mögliche Co-Lokalisation verschiedener Proteine ziehen zu können. Es ist möglich, zwei Proteine in derselben Zelle gleichzeitig anzufärben. Dafür wurde zunächst eine komplette Immunfluoreszenzfärbung für das ZAP90-Protein gemäß obigem Protokoll durchgeführt. Der Sekundärantikörper war Rhodamine -gekoppelt. Danach folgte die Inkubation mit dem direkt Fluorescein-markierten M30-Antikörper und die Kernfärbung. Grün- und rot-fluoreszierende Punkte gleicher Lokalisation erschienen gelb.

Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop [Carl Zeiss Jena] rechnergestützt durch das AxioCam[Carl Zeiss]-Programm.

- Eingesetzte Antikörper:

ZAP90 - Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde die Expression und intrazelluläre Verteilung des ZAP90-Proteins in HepG2- und Hep3B-Zellen untersucht.

Ein monoklonaler Antikörper gegen das ZAP90-Protein aus der Maus, 3c, wurde durch Herrn Dr. Günther in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Heidebrecht vom Pathologischen Institut (UK-SH, Campus Kiel) etabliert. Von murinen Lymphozyten produziert, wird der Antikörper in das Zellkulturmedium abgegeben und kann dann verdünnt direkt als primärer Antikörper eingesetzt werden. Der 3c-Antikörper wurde in der Verdünnung 1:5 in TBS eingesetzt.

M30 - Dieser fluoreszenzmarkierte Antikörper ist gegen die CK18-Fragmente gerichtet, die durch die Caspase-Spaltung während der frühen Apoptose freigesetzt werden. Als Epitop dient die dadurch entstandene Bindungsstelle an Asp396 (M30 Neoantigen). Damit konnte der Verlauf und das Ausmaß der Apoptose nachgewiesen werden. M30 CytoDeath® ist ein monoklonale murine Antikörper der Firma Roche® und wurde nach Herstellerangaben in der Verdünnung 1:250 eingesetzt.

2.2.4 siRNA

Mit Hilfe von siRNA (**s**mall **i**nterfering **R**NA) können bestimmte Gene vorübergehend ausgeschaltet werden. Das Verfahren wird allgemein als RNAi (RNA interference) bezeichnet. Dabei bewirkt die siRNA die Degradation spezifischer mRNA, so dass die Synthese des dazugehörigen Proteins für eine gewisse Zeit gestoppt wird (Dykxhoorn *et al.*, 2003). Dieses dient einerseits dem Abbau von Fremd-RNA, z.B. der von Viren, andererseits der zellinternen Regulation und kann zur posttranskriptionellen Stilllegung eines gewünschten Gens genutzt werden.

siRNA besteht aus 21-23 Nukleotiden doppelsträngiger RNA (dsRNA) mit symmetrischen Überhängen sowie einer Hydroxylgruppe am 3´Ende und einer Phosphatgruppe am 5´Ende. Sie entsteht bei der Zerteilung der dsRNA durch das Enzym DICER. Die Endonuklease wird ATP-abhängig entlang der dsRNA transloziert und schneidet dabei die siRNA-Fragmente mit den charakteristischen Fragmenten. Diese binden an den RISC-Komplex, einem Ribonukleoprotein-Komplex mit Nuklease-Aktivität. Die siRNA muss doppelsträngig sein, um von RISC erkannt zu werden, sowie entwunden, um RISC zu aktivieren. Mit Hilfe der inkorporierten siRNA-Fragmente bindet RISC komplementär an mRNA und schneidet diese (**Abb. 2.1**). Sie kann nun nicht mehr als Matrize zur Translation fungieren.

In den vorliegenden Versuchen wurde eine Translationshemmung von AKT durchgeführt. Die transfizierten Zellen konnten nach der siRNA-Behandlung zudem mit Retinolsäure stimuliert werden.

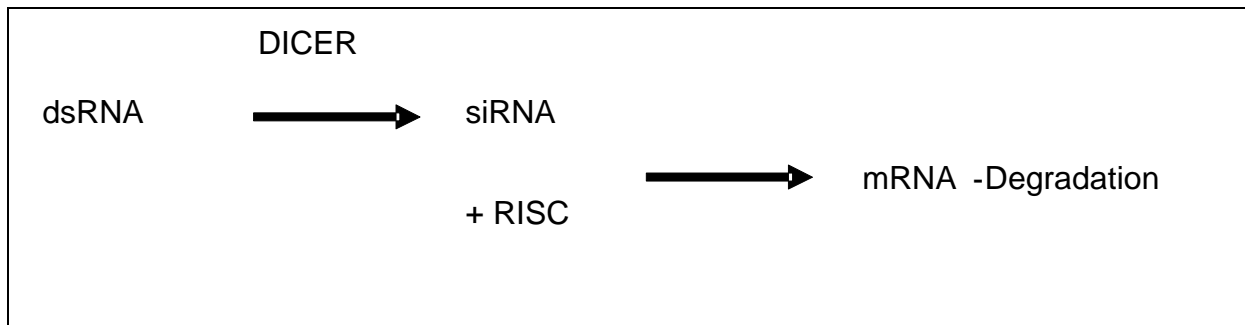


Abb. 2.1: Das Prinzip der Translationsinhibition durch siRNA: Der DICER-Enzymkomplex zerteilt die dsRNA in kleinere Fragmente, die siRNAs. Diese binden an den RISC-Komplex, der die komplementäre mRNA fragmentiert.

- Versuchsprotokoll:

HepG2-Zellen wurden gemäß obigem Protokoll auf 12-well-Platten in 10%igem FCS-Medium kultiviert. Nach 24 Stunden begann die Transfektion. Dazu wurde zunächst 2µl des Transfektionsreagenz™ mit 100µl FCS-freiem Medium in ein 1,5ml Reagiergefäß gegeben, durchmischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 3µl in RNase-freiem Wasser gelöste siRNA hinzugefügt und erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mediumwechsel in den Zellen mit 500µl frischen Medium pro well durchgeführt. Anschließend wurde der Inhalt der einzelnen 1,5ml Reagiergefäße dazugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 50 nM siRNA je well einstellte. Zusätzlich wurde zu einer Zellprobe unspezifische SignalSilence™ Control siRNA gegeben, die mit Fluorescein konjugiert war. Die Transfektionsrate konnte dadurch nach 24 Stunden mit dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Die übrigen Zellen wurden nach einem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden kultiviert. Nach insgesamt 48-stündiger Transfektion erfolgte die Ernte und die Aufarbeitung zur Western-Blot Analyse.

- siRNA Kit:

Zur AKT-Translationshemmung wurde das SignalSilence™ AKT-Kit der Firma CELL SIGNALING Technology® benutzt. Es beinhaltet die SignalSilence™ Control siRNA

(Fluorescein-konjugiert), die spezifische siRNA und das Transfektionsreagenz™. Die Spezifität wurde durch die Western-Blot Analyse von AKT und der Negativkontrolle von p44/42MAPK überprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Apoptoseinduktion durch Retinoide

3.1.1 Apoptosemessung mittels CK18

Retinolsäure ist ein bekannter Apoptoseinduktor. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz sollte die Apoptoseinduktion bei den hepatozellulären Karzinomzelllinien Hep3B und HepG2 gezeigt werden. Dafür wurde die Spaltung der Cytokeratine in der Apoptose untersucht.

Cytokeratine werden zellspezifisch exprimiert und kommen in Heteropolymeren der sauren Typ I Keratine (9-20) mit den neutralen bis basischen Typ II Keratinen (1-8) vor. Hepatozyten und Zellen des hepatozellulären Karzinoms exprimieren das CK-Paar 8/18.

Mit Hilfe des M30-Antikörpers (M30 CytoDeath®) ist es möglich, Apoptose darzustellen. Dieser fluoreszenzmarkierte Antikörper zeigt die CK18-Fragmente, die durch Caspase-Spaltung freigesetzt werden. Bei der frühen Proteolyse des CK18 an Asp396 werden Bindungsstellen geschaffen, die als Epitop für diesen Antikörper dienen (M30 Neoantigen). Damit können der Verlauf und das Ausmaß der Apoptose nachgewiesen werden.

In den Versuchen wurden die Hep3B- und HepG2-Zellen für 48 Stunden auf Deckgläschen kultiviert und mit Retinolsäure stimuliert. Es wurden bei den Immunfluoreszenzversuchen mit 200µM atRA und 25µM 9-cisRA hohe Konzentration eingesetzt, um bereits nach einer kurzen Inkubationsdauer von 30 Minuten bis 2 Stunden Apoptose induzieren zu können. Damit sollten die frühen Veränderungen der Cytokeratinspaltung untersucht werden.

Entsprechend des Protokolls für Immunfluoreszenz inkubierte der FITC-markierte M30-Antikörper auf den Zellen. Die Kernfärbung erfolgte mit Bis-Benzimide. Durch die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Färbungen ausgewertet. Die M30 markierten CK18-Fragmente fluoreszierten dabei grün.

Unstimulierte Hep3B-Zellen zeigten keine Anfärbung (**Abb. 3.1a**). Es imponierten die großen Zellkerne. Die HepG2-Zellen waren kleiner und wiesen vereinzelt M30-Fluoreszenz auf (**Abb. 3.1b**).

Sowohl atRA- als auch 9-cisRA- Stimulation hatten apoptosespezifische Veränderungen zur Folge (**Abb. 3.2**). Manche Zellkerne der Hep3B- und HepG2-Zellen wurden kleiner und rundeten sich ab. Sie bildeten typische Membranblasen (membrane blebbing) aus, es schnürten sich apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) ab. Diese Zellen ließen sich durch M30 anfärben. Das Verteilungsmuster des Antikörpers änderte sich bei beiden Zelllinien zeitabhängig. Zunächst war eine retikuläre Morphologie erkennbar. Die starke Fluoreszenz der faserartigen Formationen lag unregelmäßig im Cytoplasma vor.

In der frühen Apoptose beginnt die Caspase-Spaltung etwa nach 30 Minuten im DALD- Motiv (Asp396) und nach 2 Stunden im VEVD-Motiv (Asp237). Diese CK18-Fragmente bleiben aber noch an ihrem Interaktionspartner CK8 gebunden, welcher nicht gespalten wird. Das M30-Verteilungsmuster bleibt retikulär. Erst nach ca. 3 Stunden werden die gespaltenen CK18-Fragmente in Lysosome verpackt. Die M30 Färbung erscheint vesikulär.

Es zeigten sich bläschenartige Formationen, die bei den Hep3B-Zellen das gesamte Cytoplasma ausfüllten (**Abb. 3.2a,b**). Die HepG2-Zellen wiesen ein unregelmäßiges Vorkommen dieser Vesikel auf (**Abb. 3.2c,d**).

Weiterhin fand man bei beiden Zelllinien auch Formationen, in denen unsynchronisiert retikuläre und vesikuläre M30-Verteilungen auftraten.

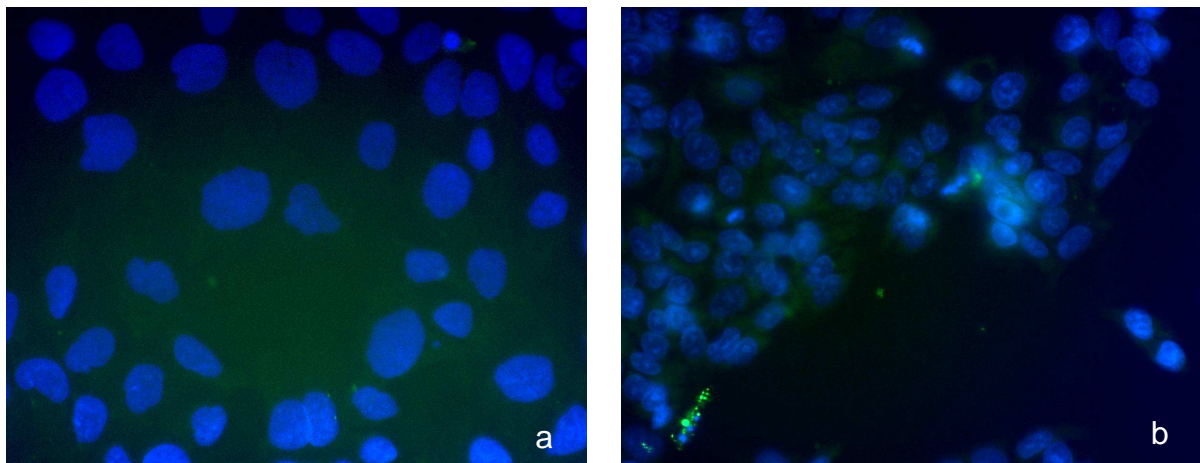


Abb. 3.1: *Unstimulierte hepatozelluläre Karzinomzellen in der M30-Immunfluoreszenz.* Nach Wachstum von Hep3B- und HepG2-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® bleiben Hep3B-Zellen im Fluoreszenzmikroskop ohne M30-Anfärbung (a). HepG2-Zellen zeigen vereinzelt M30-Fluoreszenz (b).

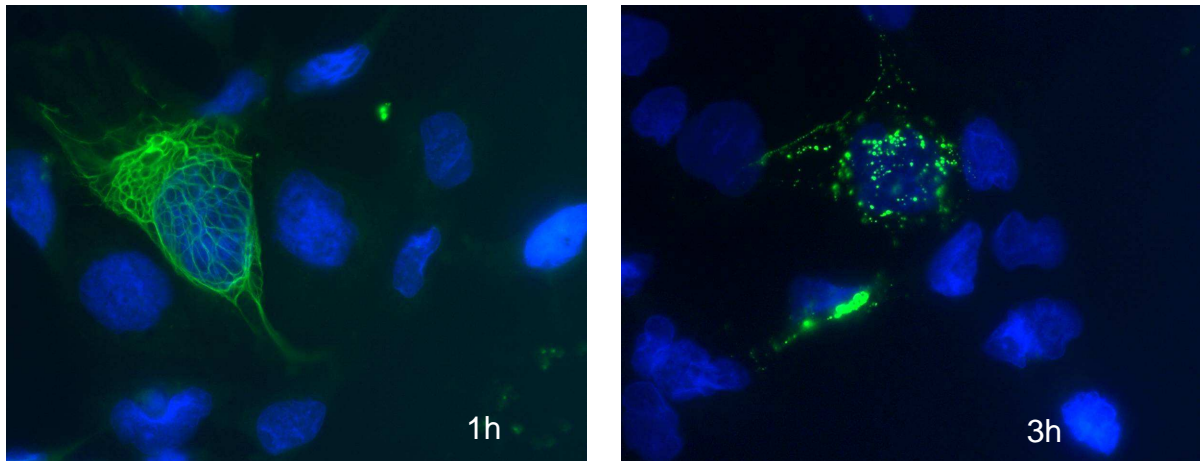


Abb. 3.2a: Verlauf der M30-Fluoreszenzsignale in der atRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Wachstum von Hep3B-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 1h und 3h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigt sich in der Fluoreszenzuntersuchung bei den 1-stündig stimulierten Hep3B-Zellen eine retikuläre Verteilung. Im Verlauf werden die CK18-Fragmente in Zellkompartimente verpackt und lassen sich nach 3h vesikulär darstellen.

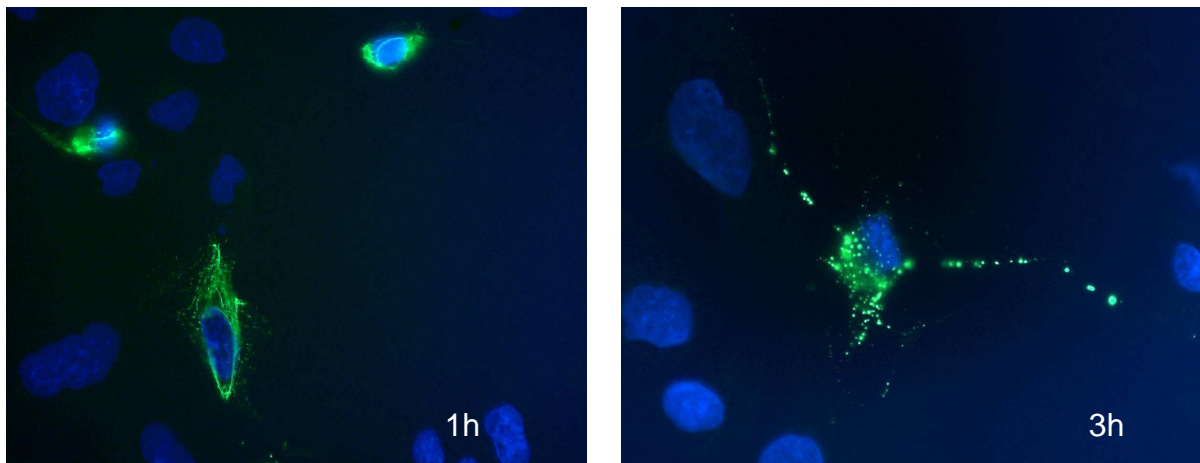


Abb. 3.2b: Verlauf der M30-Fluoreszenzsignale in der 9-cisRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Wachstum von Hep3B-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen mit 25 μ M 9-cis Retinolsäure für 1h und 3h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigt sich in der Fluoreszenzuntersuchung bei den 1-stündig stimulierten Hep3B-Zellen eine retikuläre Verteilung. Analog zur atRA-induzierten Apoptose lassen sich im Verlauf nach 3h vesikuläre Fluoreszenzsignale finden.

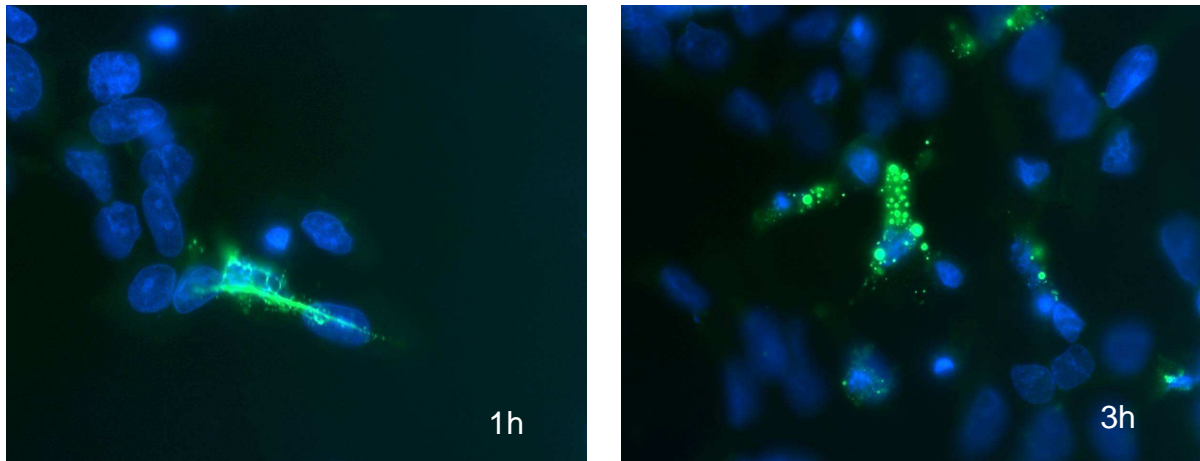


Abb. 3.2c: Verlauf der M30-Fluoreszenzsignale in der atRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Wachstum von HepG2-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 1h und 3h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigen sich in der Fluoreszenzuntersuchung bei den 1-stündig stimulierten HepG2-Zellen faserartige Formationen. Nach 3h beobachtet man eine bläschenförmige M30-Verteilung im Cytoplasma.

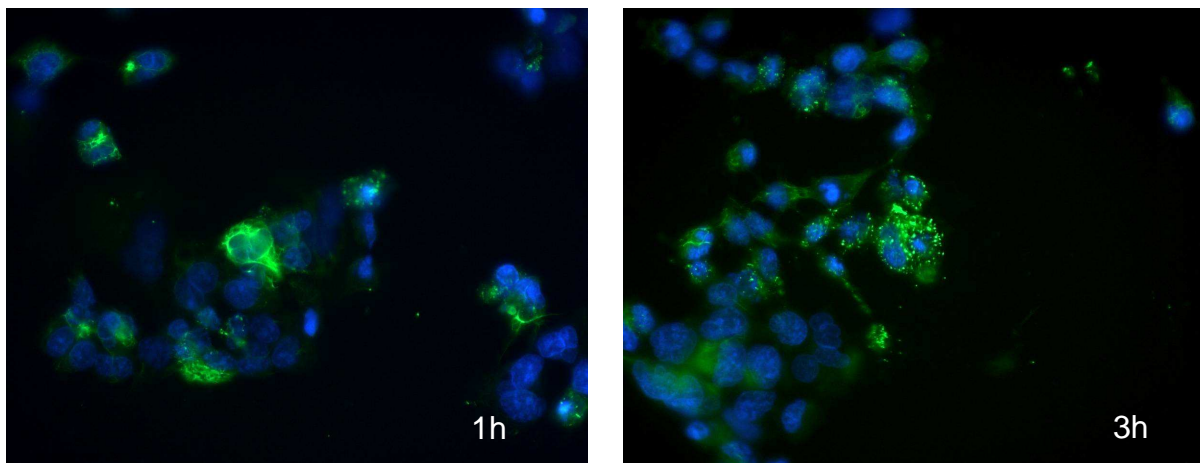


Abb. 3.2d: Verlauf der M30-Fluoreszenzsignale in der 9-cisRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Wachstum von HepG2-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen mit 25 μ M 9-cis Retinolsäure für 1h und 3h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigen sich in der Fluoreszenzuntersuchung bei den 1-stündig stimulierten HepG2-Zellen retikuläre Formationen. Nach 3h lässt sich eine vesikuläre M30-Morphologie finden.

3.1.2 Zeitkinetik der Retinolsäure-induzierten Apoptose

Eine weitere Methode, Apoptose zu messen, ist die Bestimmung von apoptosespezifischen Proteinspaltprodukten im Western-Blot. Hierbei können qualitative und bedingt quantitative Aussagen getroffen werden. Die Messung des cIAP (cleaved Poly-ADP-Ribose-Polymerase) ist eine etablierte Arbeitsweise. Die Spaltung der DNA-Reparatur-Enzyme ist eine mögliche Endstrecke der Apoptose. Genau wie die Proteolyse des CK18 zeigt sie eine Caspase-Aktivität an.

Die beschriebenen CK18-Fragmente ließen sich neben der Immunfluoreszenz auch im Western-Blot nachweisen. Der Nachweis von cIAP und CK18 eignete sich in den Versuchen zur Apoptosemessung.

Im Folgenden sollte die Retinolsäure-vermittelte Apoptose in den hepatozellulären Karzinomzelllinien untersucht werden. Geprüft wurde die Auswirkung der Stimulationsdauer auf die Apoptose in beiden Zelllinien.

Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die Hep3B- und HepG2-Zellen zeitabhängig mit 100µM atRA stimuliert. Für die Western-Blot Analyse wurde eine niedrigere Retinolsäurekonzentration als in den Immunfluoreszenzversuchen gewählt, um die Kinetik über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Das führte zu einem gleichmäßigen Anstieg der Apoptosemarkerbanden im Western-Blot, der bereits nach 30 Minuten begann und bis zu 18 Stunden maximiert werden konnte (**Abb. 3.3a, Abb. 3.4a**). Analog dazu war in der Immunfluoreszenz zunächst eine Grundfluoreszenz von M30 erkennbar, die mit höherer Stimulationszeit deutlich verstärkt werden konnte. Je länger mit Retinolsäure inkubiert wurde, desto mehr Apoptose wurde induziert, und die Zellen wiesen eine vesikuläre Morphologie auf (**Abb. 3.5a, Abb. 3.6a**).

Unstimulierte Zellen zeigten nach 18 Stunden ebenfalls stärkere Banden der Apoptosemarker im Western-Blot. Vermehrte Apoptose war auch in der Immunfluoreszenz zu beobachten.

Ein ähnliches Ergebnis war bei der 9-cisRA Stimulation zu sehen (**Abb. 3.3b, Abb. 3.4b, Abb. 3.5b, Abb. 3.6b**). Die Inkubation mit 25µM 9-cisRA führte beide Zelllinien zeitabhängig in die Apoptose. Bei den HepG2-Zellen zeigten bereits 10µM 9-cisRA ab 2-4 Stunden einen leichten Anstieg der Apoptosemarker.

Langfristige Stimulierungen mit 25 μ M 9-cisRA über Zeiträume von 6 und 18 Stunden hatten einen starken apoptotischen Effekt. Auf den Deckgläschen ließen sich kaum noch Hep3B-Zellen nachweisen. In der Immunfluoreszenz waren die wenigen Hep3B-Zellen vollständig angefärbt und wiesen ein untypisches M30-Färbemuster ohne vesikuläre Morphologie auf (**Abb. 3.5b**). Die abgelösten Zellen waren apoptotisch und damit nicht mehr adhären. Für die Western-Blot Analyse konnte somit keine ausreichende Proteinmenge aufgetragen werden (**Abb. 3.3b**).

Insgesamt zeigte sich in den Zeitkinetikversuchen, dass in beiden Zelllinien mit zunehmender Dauer der Retinolsäurestimulation eine vermehrte Apoptoserate zu beobachten war.

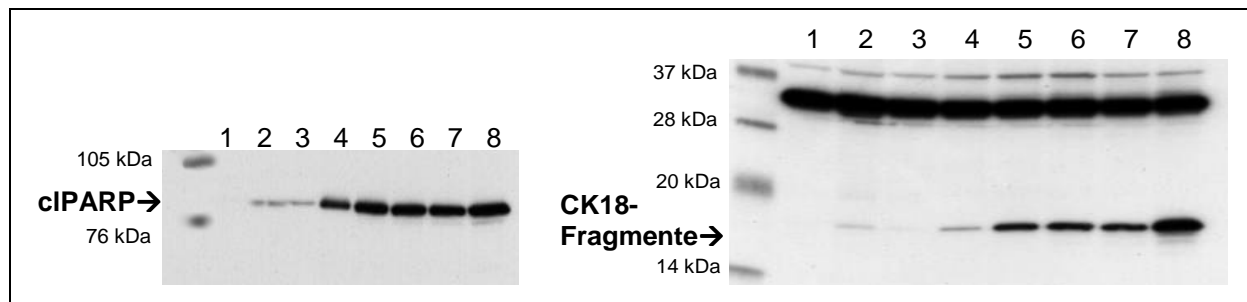


Abb. 3.3a: Zeitkinetik der atRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die Hep3B-Zellen mit 100 μ M all-trans Retinolsäure zwischen 30min und 18h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. 100 μ M atRA führt ab 1h zum Anstieg der Apoptosemarker bei den Hep3B-Zellen: Spaltprodukte von PARP sind bei jeder all-trans Retinolsäure Stimulation zu sehen. Analog dazu zeigen Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 ab 1h CK18-Fragmente im Western-Blot. (1-unstimuliert 6h, 2-unstimuliert 18h, 3-100 μ M atRA 30min, 4-100 μ M atRA 1h, 5-100 μ M atRA 2h, 6-100 μ M atRA 4h, 7-100 μ M atRA 6h, 8-100 μ M atRA 18h)

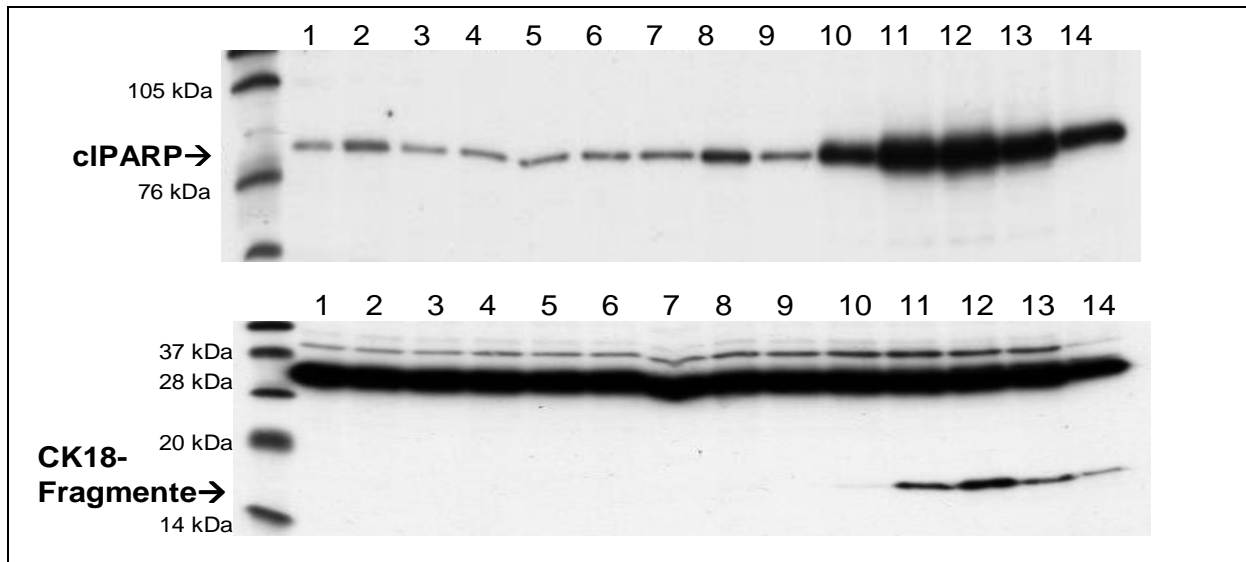


Abb. 3.3b: Zeitkinetik der 9-cisRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die Hep3B-Zellen mit 10 μ M und 25 μ M 9-cis Retinolsäure zwischen 30min und 18h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spaltprodukte von PARP sind bei 9-cis Retinolsäure Stimulation zu sehen, 10 μ M 9-cisRA induziert erst nach 18h messbar Apoptose (3-8). 25 μ M 9-cisRA zeigt bereits nach 1h Apoptose und führt zeitabhängig zu einem Anstieg der Marker (9-14). Ab der 6-stündigen Stimulation sind bereits so viele Zellen abgelöst, dass sich keine ausreichende Proteinmenge mehr auftragen lässt. Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 weisen erst ab einer 2-stündigen Stimulation mit 25 μ M 9-cisRA CK18-Fragmente im Western-Blot nach.

(1-unstimuliert 6h, 2-unstimuliert 18h, 3-10 μ M 9-cisRA 30min, 4-10 μ M 9-cisRA 1h, 5-10 μ M 9-cisRA 2h, 6-10 μ M 9-cisRA 4h, 7-10 μ M 9-cisRA 6h, 8-10 μ M 9-cisRA 18h, 9-25 μ M 9-cisRA 30min, 10-25 μ M 9-cisRA 1h, 11-25 μ M 9-cisRA 2h, 12-25 μ M 9-cisRA 4h, 13-25 μ M 9-cisRA 6h, 14-25 μ M 9-cisRA 18h)

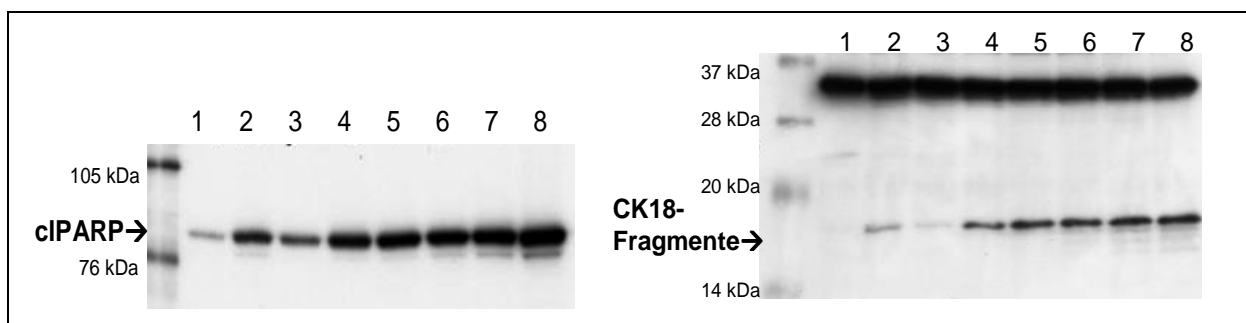


Abb. 3.4a: Zeitkinetik der atRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen mit 100 μ M all-trans Retinolsäure zwischen 30min und 18h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spaltprodukte von PARP und CK18 zeigen ab einer 30-minütigen Inkubation zeitabhängig Apoptose an.

(1-unstimuliert 6h, 2-unstimuliert 18h, 3-100 μ M atRA 30min, 4-100 μ M atRA 1h, 5-100 μ M atRA 2h, 6-100 μ M atRA 4h, 7-100 μ M atRA 6h, 8-100 μ M atRA 18h)

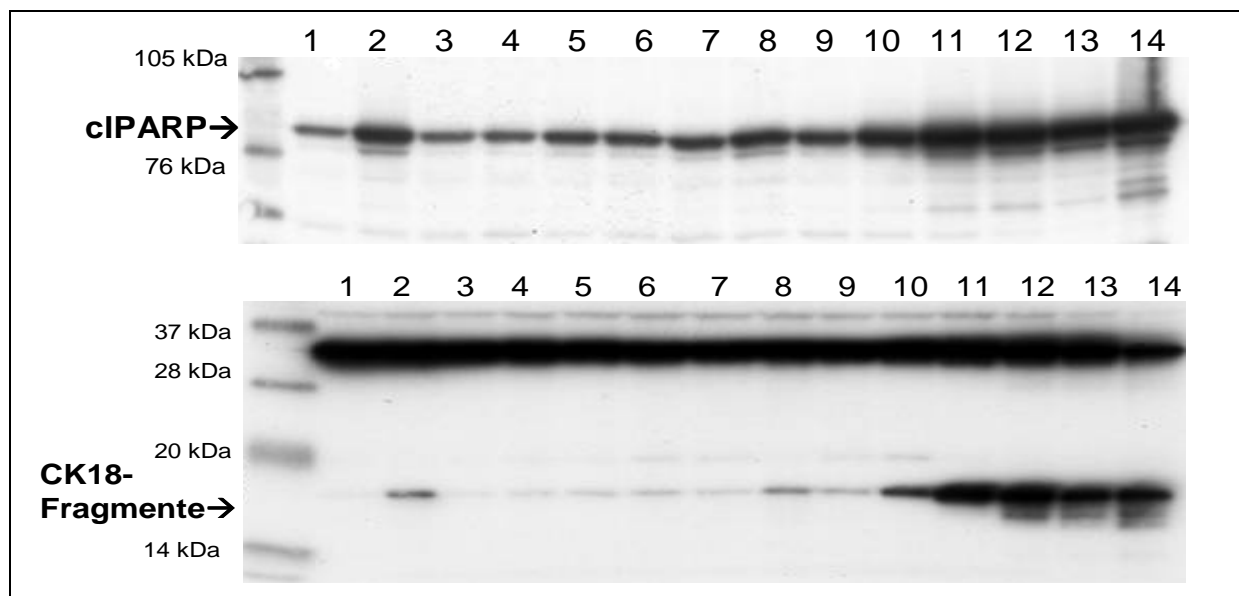


Abb. 3.4b: Zeitkinetik der 9-cisRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen mit 10 μ M und 25 μ M 9-cis Retinolsäure zwischen 30min und 18h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spezifische Antikörper gegen cIAP1 zeigen Signale nach 18-stündiger 9-cisRA-Stimulation mit 10 μ M (3-8). 25 μ M 9-cisRA zeigt bereits nach 1h einen Anstieg der Marker (9-14). Analog dazu weisen Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 eine zeitabhängige Apoptoseinduktion durch 9-cis Retinolsäure im Western-Blot nach. (1-unstimuliert 6h, 2-unstimuliert 18h, 3-10 μ M 9-cisRA 30min, 4-10 μ M 9-cisRA 1h, 5-10 μ M 9-cisRA 2h, 6-10 μ M 9-cisRA 4h, 7-10 μ M 9-cisRA 6h, 8-10 μ M 9-cisRA 18h, 9-25 μ M 9-cisRA 30min, 10-25 μ M 9-cisRA 1h, 11-25 μ M 9-cisRA 2h, 12-25 μ M 9-cisRA 4h, 13-25 μ M 9-cisRA 6h, 14-25 μ M 9-cisRA 18h)

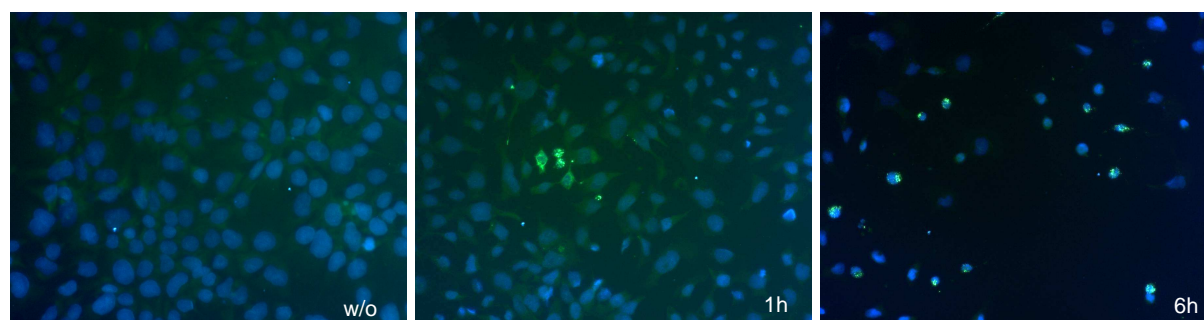


Abb. 3.5a: Zeitkinetik der atRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Wachstum von Hep3B-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (w/o), oder mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 1h und 6h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigt sich im Leerwert keine Anfärbung. Bei den 1-stündig stimulierten Hep3B-Zellen zeigen sich vereinzelt Fluoreszenzmuster. Im Verlauf kommt es nach 6h zu verplumpten Zellkernen mit Zunahme der M30-Anfärbung.

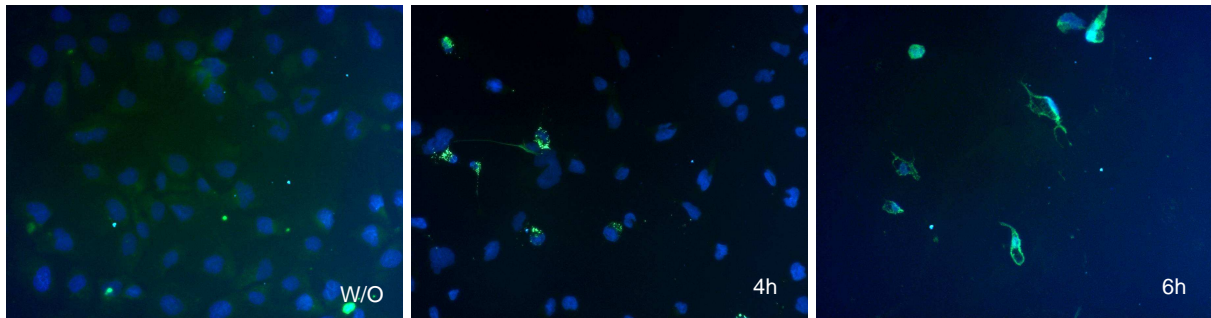


Abb. 3.5b: Zeitkinetik der 9-cisRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Wachstum von Hep3B-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (w/o), oder mit 25µM 9-cis Retinolsäure für 4h und 6h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigt sich im Leerwert keine Anfärbung. Bei den 4-stündig stimulierten Hep3B-Zellen zeigen sich überwiegend vesikuläre Fluoreszenzmuster. Nach 6h sind viele Zellen abgelöst; die restlichen sind stark zerstört und untypisch angefärbt.

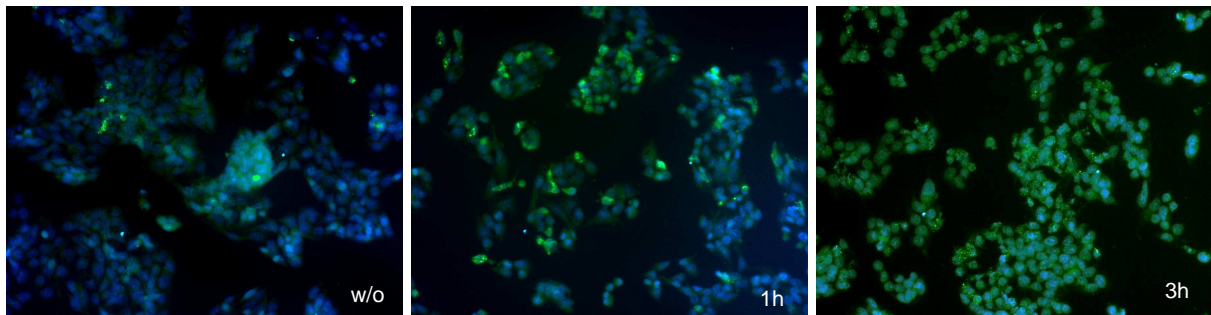


Abb. 3.6a: Zeitkinetik der atRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Wachstum von HepG2-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (w/o), oder mit 200µM all-trans Retinolsäure für 1h und 3h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigt sich im Leerwert eine geringe Grundaktivität, die auch im Western-Blot zu sehen ist. Bereits nach 1h atRA-Stimulation (200µM) lösen sich Zellen ab und die M30-Fluoreszenzaktivität steigt. Nach 3h nimmt die M30-Anfärbung weiter zu.

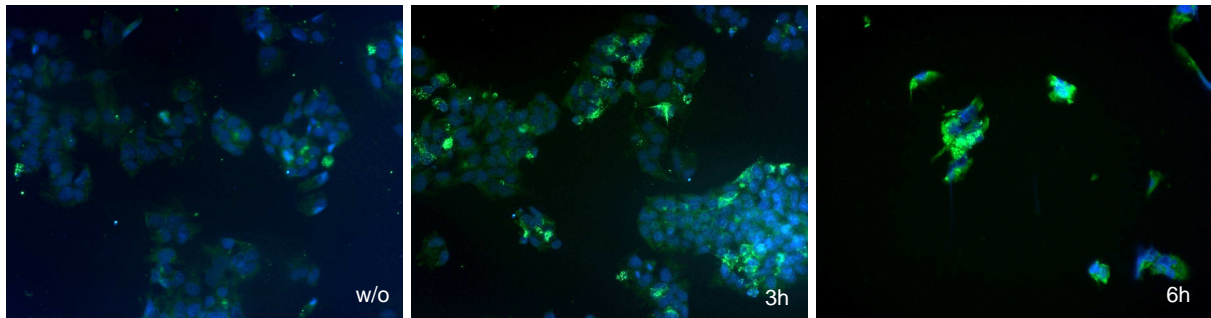


Abb. 3.6b: Zeitkinetik der 9-cisRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Wachstum von HepG2-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (w/o), oder mit 25µM 9-cis Retinolsäure für 3h und 6h stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit M30 CytoDeath® zeigt sich bereits bei unstimulierten Zellen eine geringe Apoptoserate. 3-stündig stimulierte HepG2-Zellen zeigen nach 3h eine deutlich gesteigerte M30 -Anfärbung mit retikulärer und vesikulärer Verteilung. Eine 6-stündige Inkubation führt zu starkem Zellverlust; die restlichen Zellen sind zerfallen und fluoreszieren deutlich.

3.1.3 Konzentrationskinetik der Retinolsäure-induzierten Apoptose

Nach gezeigter Zeitkinetik galt es nun, einen genaueren Konzentrationsbereich für die Retinolsäure-induzierte Apoptose einzugrenzen.

Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für weitere 24h wurden die Hep3B- und HepG2-Zellen konzentrationsabhängig mit atRA stimuliert. Für eine 6- und 18-stündige atRA Stimulation zeigte sich bei beiden Zelllinien ein wirksamer Dosisbereich zwischen 25µM und 200µM. Jede Konzentration konnte Apoptose auslösen. Hohe Dosen von atRA führten zu einem verstärkten Anstieg von cIPARP und CK18-Fragmenten im Western-Blot (**Abb. 3.7**).

Zur Beurteilung einer wirksamen 9-cisRA Konzentration wurde der Dosisbereich zwischen 5µM und 100µM untersucht (**Abb. 3.8**). Eine signifikante Apoptose wurde für beide Zelllinien erst ab einer 6-stündigen 25µM 9-cisRA Stimulation ausgelöst. Weder durch eine längere Inkubation, noch durch höhere Dosen war ein deutlicherer Anstieg der Apoptosemarker nachzuweisen.

Bei Werten über 25µM 9-cisRA hatten sich die meisten Hep3B-Zellen vom Boden der Zellkulturplatten abgelöst. Es war daher nicht möglich, eine ausreichende

Proteinmenge für die Western-Blot Analyse aufzutragen. Die Anfälligkeit dieser Zelllinie gegenüber einer hochdosierten und langen 9-cisRA Stimulation wurde bereits in den Zeitkinetikversuchen festgestellt.

Die Apoptose ist demnach abhängig von der eingesetzten Konzentration und der Dauer der Retinolsäurestimulation. Diese Ergebnisse wurden in der Immunfluoreszenz bestätigt (Daten nicht gezeigt).

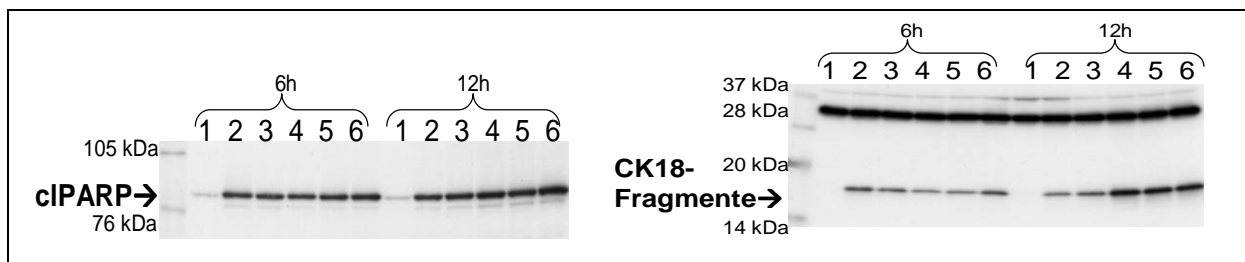


Abb. 3.7a: Konzentrationskinetik der atRA-induzierten Apoptose in den Hep3B-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die Hep3B-Zellen mit 25 μ M bis 200 μ M all-trans Retinolsäure (1-6) für 6h und 12h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spaltprodukte von PARP und CK18 weisen im Western-Blot nach, dass in den Hep3B-Zellen jede eingesetzte atRA Menge dosisabhängig Apoptose auslöst.
(1-unstimuliert, 2-25 μ M atRA, 3-50 μ M atRA, 4-100 μ M atRA, 5-150 μ M atRA, 6-200 μ M atRA)

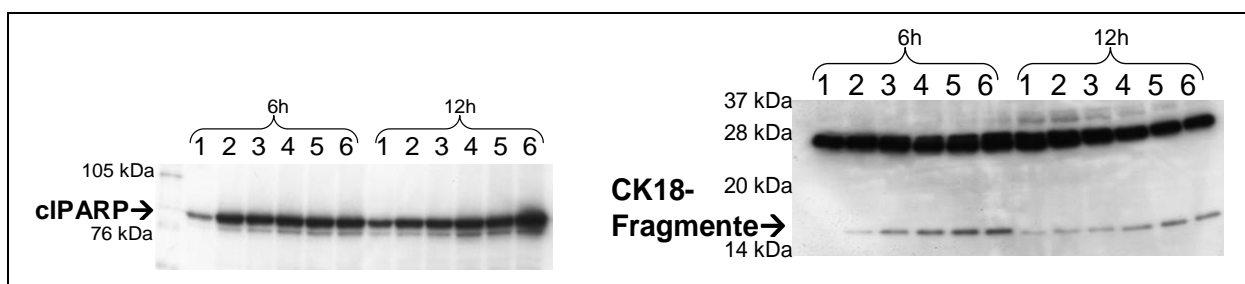


Abb. 3.7b: Konzentrationskinetik der atRA-induzierten Apoptose in den HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen mit 25 μ M bis 200 μ M all-trans Retinolsäure (1-6) für 6h und 12h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spezifische Antikörper gegen cIPARP und Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 zeigen im Western-Blot, dass in den HepG2-Zellen ab 25 μ M atRA Apoptose induziert und konzentrationsabhängig gesteigert werden kann.
(1-unstimuliert, 2-25 μ M atRA, 3-50 μ M atRA, 4-100 μ M atRA, 5-150 μ M atRA, 6-200 μ M atRA)

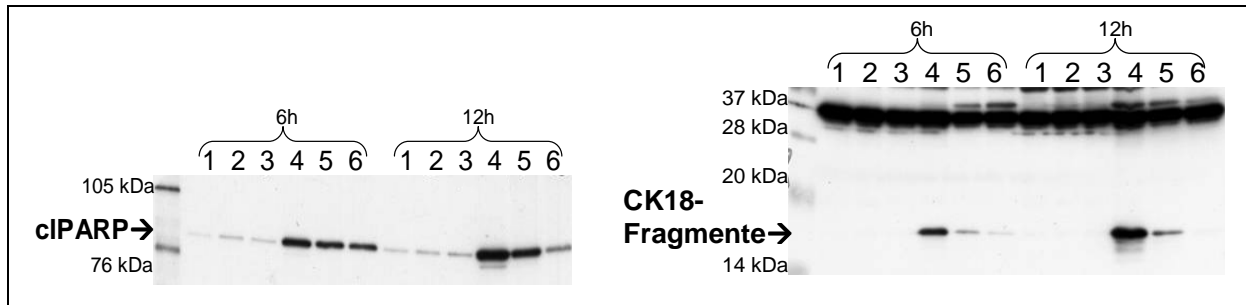


Abb. 3.8a: Konzentrationskinetik der 9-cisRA-induzierten Apoptose in den Hep3B-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die Hep3B-Zellen mit 5 μ M bis 100 μ M 9-cis Retinolsäure (1-6) für 6h und 12h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Durch die Spaltprodukte von PARP und die CK18-Fragmente ist in den Hep3B-Zellen eine Apoptoseinduktion ab 25 μ M 9-cisRA nachweisbar. Nach Stimulation mit höheren Dosen 9-cisRA sind bereits so viele Zellen abgelöst, dass sich keine ausreichende Proteinmenge mehr auftragen lässt. (1- unstimuliert, 2-5 μ M 9-cisRA, 3-10 μ M 9-cisRA, 4-25 μ M 9-cisRA, 5-50 μ M 9-cisRA, 6-100 μ M 9-cisRA)

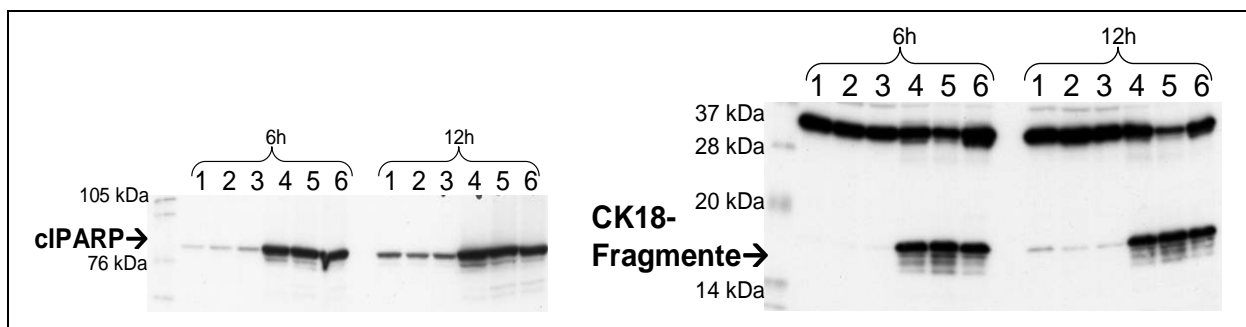


Abb. 3.8b: Konzentrationskinetik der 9-cisRA-induzierten Apoptose in den HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen mit 5 μ M bis 100 μ M 9-cis Retinolsäure (1-6) für 6h und 12h inkubiert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spezifische Antikörper gegen cIPARP und Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 zeigen im Western-Blot, dass in den HepG2-Zellen ab 25 μ M 9-cisRA Apoptose induziert werden kann, die durch höhere Konzentrationen nicht wesentlich gesteigert werden kann. (1- unstimuliert, 2-5 μ M 9-cisRA, 3-10 μ M 9-cisRA, 4-25 μ M 9-cisRA, 5-50 μ M 9-cisRA, 6-100 μ M 9-cisRA)

3.2 Die MAP-Kinasen in der all-trans Retinolsäure-vermittelten Apoptose

3.2.1 Analyse der FCS-Präinkubation

In den Nährmedien beider Zelllinien ist fetales-Kälber-Serum (FCS) enthalten. Dadurch wird die Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren gewährleistet. Viele *Survival*-Signalwege werden durch Stimulierung mit solchen Mitogenen angeregt. Es kommt unter anderem zur Aktivierung der MAP-Kinasen. Außerdem enthält FCS mit dem Albumin ein Trägerprotein für lipophile Substanzen, wie z.B. Retinolsäure.

Die Zellen wurden für die Versuche insgesamt 48 Stunden kultiviert, bevor jeweils mit Retinolsäure Apoptose induziert wurde. Die ersten 24 Stunden wurde ein Medium mit einem 10%igen FCS Anteil verwendet. Für die nächsten 24 Stunden wurde dann ein 0,5%iges Nährmedium eingesetzt.

Der Einfluss des FCS-vermittelten Wachstums auf die atRA-induzierte Apoptose und eine mögliche Inaktivierung durch Bindung der lipophilen Retinolsäure an Albumin sollten genauer geprüft werden. Dazu wurden die hepatozellulären Karzinomzellen vor der Retinolsäure-Stimulation jeweils 30 Minuten mit FCS (0,5% und 5%) präinkubiert.

Kurze (2 Stunden) und lange (18 Stunden) atRA Stimulation mit 200µM lösten Apoptose aus (**Abb. 3.9, Abb. 3.10**). Unstimulierte Zellen wiesen bereits im Leerwert ein schwaches Signal von cIAP¹ und CK18-Fragmenten im Western-Blot auf. Die 30-minütige FCS-Behandlung zeigte im Western-Blot bei den HepG2-Zellen eine Abnahme dieser Marker. Es konnte aber in beiden Zelllinien weiterhin Apoptose ausgelöst werden, obwohl die Zellen mit FCS präinkubiert wurden. AtRA-induzierte Apoptose war in den HepG2- und Hep3B-Zellen trotz einer 0,5% bzw. 5% FCS-Präinkubation möglich.

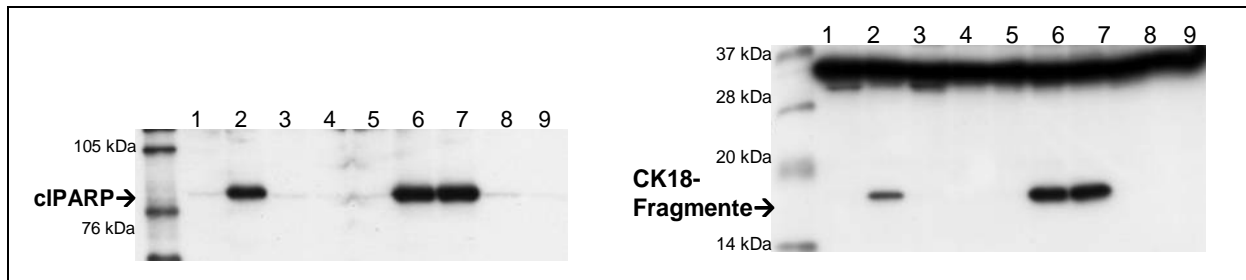


Abb. 3.9: Western-Bot Untersuchung der 30-minütigen FCS Präinkubation und nachfolgenden 2-stündigen atRA Stimulation bei den Hep3B-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die Hep3B-Zellen zum Teil mit 0,5% FCS oder 5% FCS für 30min präinkubiert (4-7). Danach erfolgte eine Stimulation mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 2h und die anschließende Vorbereitung für die Western-Blot Untersuchungen. Die Marker cIPARP und fragmentiertes CK18 zeigen eine Apoptoseinduktion nach 2h 200 μ M atRA-Stimulation an. Diese scheint unabhängig von der FCS Präinkubation zu sein, die 30-minütige FCS Präinkubation kann die Apoptosewirkung der 2-stündigen atRA Stimulation in den Hep3B-Zellen nicht vermindern.
(1-unstimuliert, 2-200 μ M atRA 2h, 4-0,5% FCS 30min, 5-5% FCS 30min, 6-0,5% FCS 30min +200 μ M atRA 2h, 7-5% FCS 30min + 200 μ M atRA 2h)

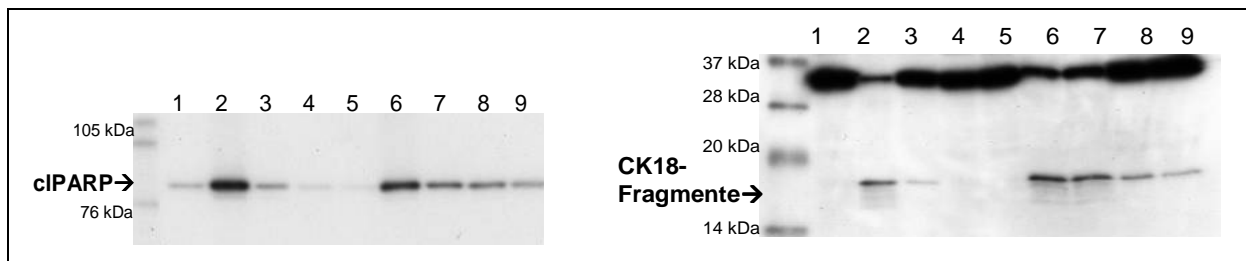


Abb. 3.10: Western-Bot Untersuchung der 30-minütigen FCS Präinkubation und nachfolgenden 18-stündigen atRA Stimulation bei den HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen zum Teil mit 0,5% FCS oder 5% FCS für 30min präinkubiert (4-7). Danach erfolgte eine Stimulation mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 18h und die anschließende Vorbereitung für die Western-Blot Untersuchungen. Spezifische Antikörper gegen cIPARP und Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 zeigen, dass in den HepG2-Zellen durch eine FCS Präinkubation die atRA-induzierte Apoptose nicht vermindert wird. FCS-Behandlung verringert allerdings die Apoptoserate in unstimulierten Zellen.
(1-unstimuliert, 2-200 μ M atRA 18h, 4-0,5% FCS 30min, 5-5% FCS 30min, 6-0,5% FCS 30min + 200 μ M atRA 18h, 7-5% FCS 30min + 200 μ M atRA 18h)

3.2.2 TPA aktiviert die p44/42MAPK

In vorhergehenden Arbeiten (Fürst, 2008) konnte gezeigt werden, dass die Retinolsäure die Apoptose unter anderem über die Aktivierung von JNK und p38MAPK induziert. Diesen Proteinkinasen steht die p44/42MAPK gegenüber. Die Folge einer ERK1/2-Stimulierung sind vor allem Wachstum und Differenzierung. Aktivierung der p44/42MAPK konnte in einigen Zellen die Apoptose inhibieren. Um die Rolle dieser MAPK bei der RA-vermittelten Apoptose zu prüfen, sollte der ERK1/2-Signalweg in den HepG2-Zellen stimuliert werden.

Eingesetzt wurde der Phorbolster TPA (Tetradecanoylphorbolacetat), der die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und somit zur ras-GTP Bindung führt. Eine 30-minütige Präinkubation mit 0,1µg/ml TPA verursachte eine anhaltende Phosphorylierung von ERK1/2. Während sich der Gehalt des Gesamt-p44/42 nicht änderte, kam es in den TPA behandelten Zellen zum Anstieg des phosphorylierten p44/42 (**Abb. 3.11a**). Eine kurzzeitige (0,5-2 Stunden) Stimulation mit 200µM RA hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p44/42.

Deutliche Apoptose zeigten die 1- und 2-stündig mit 200µM atRA behandelten Zellen. TPA allein führte zu keinem Anstieg von cIAPR oder CK18-Fragmenten. Die 30-minütige Präinkubation hatte eine verminderte Apoptoserate in den Retinolsäure stimulierten HepG2-Zellen zur Folge (**Abb. 3.11b**). TPA bewirkte somit eine Phosphorylierung von p44/42 und eine Hemmung der atRA-vermittelten Apoptose.

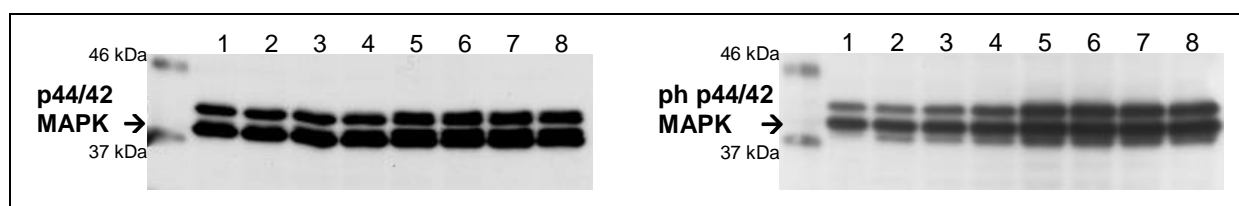


Abb. 3.11a: Analyse der p44/42MAPK und ihrer Phosphorylierung nach TPA- und atRA-Stimulation in den HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen zum Teil 30min mit 0,1 µg/ml TPA inkubiert (5-8) und mit 200µM all-trans Retinolsäure zwischen 30min und 2h stimuliert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Im Vergleich zum Leerwert bleibt die p44/42MAPK durch Inkubation mit all-trans Retinolsäure bzw. TPA in ihrer Aktivität unbeeinflusst hoch. In den TPA-stimulierten Zellen gelingt dagegen der vermehrte Nachweis der phosphorylierten Form von p44/42MAPK durch spezifische Antikörper gegen Phospho-P44/42MAPK. (1-unstimuliert, 2-200µM atRA 30min, 3-200µM atRA 1h, 4-200µM atRA 2h, 5-30min 0,1 µg/ml TPA, 6-30min 0,1 µg/ml TPA + 200µM atRA 30min, 7-30min 0,1 µg/ml TPA + 200µM atRA 1h, 8-30min 0,1 µg/ml TPA + 200µM atRA 2h)

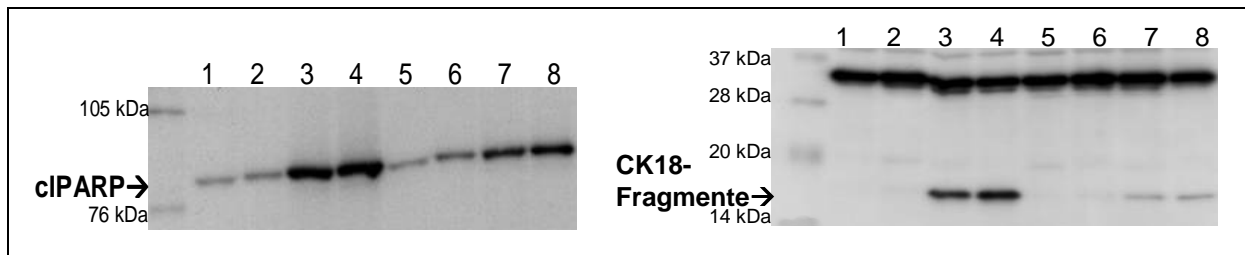


Abb. 3.11b: Analyse der Apoptosemarker nach TPA- und atRA-Stimulation in den HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen zum Teil 30min mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TPA inkubiert (**5-8**) und mit 200 μM all-trans Retinolsäure zwischen 30min und 2h stimuliert und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spezifische Antikörper gegen cIAP2 und Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 zeigen die Apoptoseinduktion durch all-trans Retinolsäure an. In den TPA-stimulierten Zellen kommt es zur Abnahme der PARP- und CK18- Spaltung, d.h. durch eine 30-minütige TPA-Präinkubation kann die atRA-induzierte Apoptose abgeschwächt werden. (1-unstimuliert, 2-200 μM atRA 30min, 3-200 μM atRA 1h, 4-200 μM atRA 2h, 5-30min 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TPA, 6-30min 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TPA + 200 μM atRA 30min, 7-30min 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TPA + 200 μM atRA 1h, 8-30min 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TPA + 200 μM atRA 2h)

3.3 Der AKT-Survival-Signalweg in der all-trans Retinolsäure-induzierten Apoptose

3.3.1 pAKT-Inhibition durch atRA und LY294002

Nachdem der Einfluss der MAP-Kinasen auf die Retinolsäure-vermittelte Apoptose geprüft wurde, sollte nun die Rolle von AKT und dem *Survival*-Signalweg näher untersucht werden.

Durch Oberflächenrezeptoren werden über „second messenger“ Signale ins Zytoplasma vermittelt. Auch Wachstumsfaktoren können rezeptorabhängig die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) aktivieren und damit den AKT-Signalweg induzieren. Phosphoryliertes AKT kann über Caspase 9- und Bad- Inhibition, NF- κ B-Aktivierung, sowie weitere Prozesse Apoptose verhindern.

In HepG2-Zellen wurde mit 6-stündiger 100 μM atRA Stimulation Apoptose induziert (**Abb. 3.12b**). Es zeigte sich, dass dabei der Gehalt des gesamten AKTs nur gering abnahm. Die phosphorylierte (Ser473) Form lag hingegen im deutlich reduzierten

Maße vor (**Abb. 3.12a**). Durch Inhibition der pAKT-Bildung konnte die Retinolsäure den *Survival*-Signalweg hemmen, Apoptose wurde induziert.

Der Einsatz des PI3K-Inhibitors LY294002 brachte keine Änderung des Gesamt-AKTs. Eine 30-minütige Präinkubation mit 50µM LY294002 hatte auch kaum einen Einfluss auf phosphoryliertes AKT. Trotzdem kam es durch die kurzfristige LY294002-Stimulation zu einem Anstieg der Apoptosemarker. Allerdings erreichte dieser nicht den Umfang der atRA-vermittelten *Survival*-Signalweg Hemmung.

Wurden die HepG2-Zellen nach 50µM LY294002-Präinkubation noch mit 100µM RA behandelt, so zeigten sich im Western-Blot eine deutliche Abnahme von phosphorylierten AKT und ein Anstieg der Apoptosemarker. Ein additiver Effekt war erkennbar.

3.3.2 siRNA AKT-Translationshemmung

Um die Bedeutung der gezeigten AKT-Inhibition für die Apoptose zu prüfen, sollte die Expression des gesamten AKT vermindert werden. Daher wurde kein aktives Enzym gehemmt, sondern die Translation dieses Proteins inhibiert.

Durch die siRNA-Methode kann eine gewünschte Proteinexpression ausgeschaltet werden. Nach erfolgreicher siRNA-Transfektion werden spezifische RNasen aktiviert. Die Zerstörung der gewünschten mRNAs führen zu Translationshemmung und einer erniedrigten Proteinexpression. Damit sind Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins möglich.

In den Versuchen wurden HepG2-Zellen für 24 Stunden kultiviert und für weitere 48 Stunden mit 50nM AKT Transfektionsreagenz gemäß dem Protokoll der siRNA-Methode inkubiert. Die Transfektionsrate wurde mit der Control-siRNA in der Immunfluoreszenz überprüft. In fast jeder Zelle war die fluoreszenzmarkierte Kontrolllösung zu finden. HepG2-Zellen eigneten sich demnach für die siRNA-Transfektion. Durch die Western-Blot Analyse sollte die geminderte AKT-Proteinexpression überprüft und die Auswirkungen auf die Apoptose untersucht werden.

Es zeigte sich eine Abnahme des gesamten AKTs (**Abb. 3.12a**). Im Gegensatz zu dem schwachen Rückgang durch eine 6-stündige 100 μ M atRA Stimulation, führte die siRNA-Behandlung zu einer deutlich verminderten AKT-Expression.

Die phosphorylierte Form war ebenfalls herabgesetzt, so dass nur noch wenig funktionelles AKT für den *Survival*-Signalweg bereitstand. Daher führte die Ausschaltung der AKT-Expression zu einer gesteigerten Apoptoserate. Durch die 6-stündige RA Stimulation konnte diese noch deutlich verstärkt werden (**Abb. 3.12b**).

Im Vergleich zur PI3K-Inhibition und der Ausschaltung der AKT-Expression zeigten die atRA behandelten HepG2-Zellen den maximalen Anstieg der Apoptosemarker.

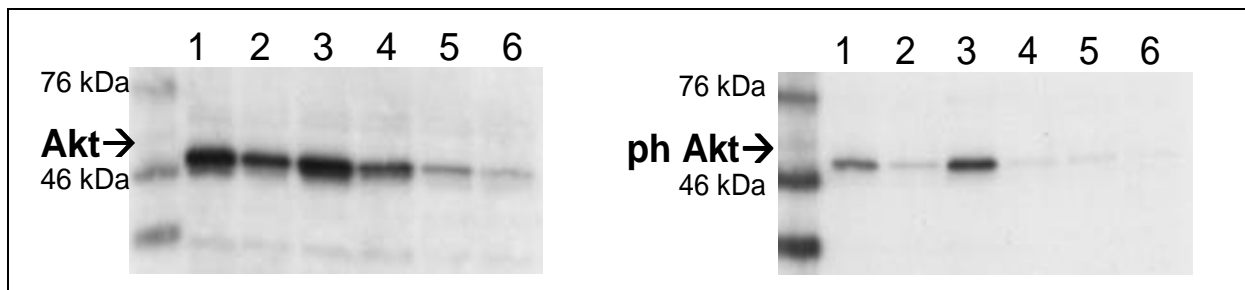


Abb. 3.12a: Untersuchung des AKT-Gesamtgehalts und phAKT (Ser 473) nach LY294002-Inkubation, atRA-Stimulation und siRNA-Behandlung in den HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen mit 100 μ M all-trans Retinolsäure für 6h (2), mit 50 μ M LY294002 für 30min (3) oder vor 6-stündiger all-trans Retinolsäure-Stimulation 30min mit 50 μ M LY294002 präinkubiert (4) und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Weiterhin wurden HepG2-Zellen für 24h kultiviert und nach anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für weitere 48h mit 50nM AKT Transfektionsreagenz inkubiert (5). Zum Teil erfolgte danach eine atRA-Stimulation mit 100 μ M für 6h (6). Im Western-Blot zeigt sich durch spezifische Antikörper gegen AKT und Phospho-AKT (Ser 473), dass die LY294002-Stimulation keinen Einfluss auf den AKT-Gesamtgehalt hat. Während eine Stimulation mit 100 μ M atRA für 6h das AKT-Signal nur leicht erniedrigt, ist die Proteinexpression nach der siRNA-Behandlung fast vollständig aufgehoben. Die atRA Stimulation und siRNA-Inkubation kann die Grundaktivität des phAKT (Ser 473) deutlich verringern, beide verhalten sich dabei additiv.

(1-unstimuliert, 2-100 μ M atRA 6h, 3-50 μ M LY294002 30min, 4-30min 50 μ M LY294002 + 100 μ M atRA 6h, 5-50nM siRNA-AKT 48h, 6-48h 50nM siRNA-AKT + 100 μ M atRA 6h)

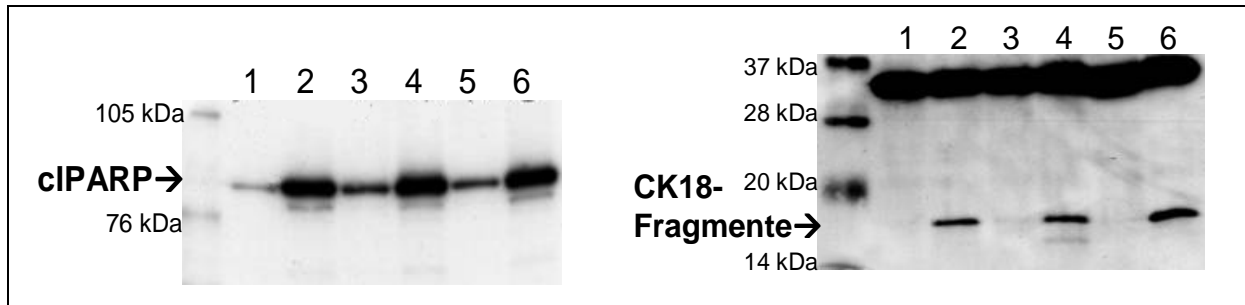


Abb. 3.12b: Untersuchung der Apoptosemarker nach LY294002-Inkubation, atRA-Stimulation und siRNA-Behandlung in den HepG2-Zellen. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2-Zellen mit 100µM all-trans Retinolsäure für 6h (2), mit 50µM LY294002 für 30min (3) oder vor 6-stündiger all-trans Retinolsäure-Stimulation 30min mit 50µM LY294002 präinkubiert (4) und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Weiterhin wurden HepG2-Zellen für 24h kultiviert und nach anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für weitere 48h mit 50nM AKT Transfektionsreagenz inkubiert (5). Zum Teil erfolgte danach eine atRA-Stimulation mit 100µM für 6h (6). Spaltprodukte von PARP und Antikörper gegen gespaltenes Cytokeratin 18 weisen im Western-Blot Apoptoseinduktion durch Stimulation mit LY294002 und all-trans Retinolsäure, sowie durch siRNA-Inkubation nach. Weiterhin zeigt sich ein additiver Effekt sowohl zur PI3K-Inhibition als auch zur Hemmung der AKT-Proteinexpression durch die atRA-Stimulation. (1-unstimuliert, 2-100µM atRA 6h, 3-50µM LY294002 30min, 4-30min 50µM LY294002 + 100µM atRA 6h, 5-50nM siRNA-AKT 48h, 6-48h 50nM siRNA-AKT + 100µM atRA 6h)

3.4 Fas- und all-trans Retinolsäure-vermittelte Apoptose im Vergleich

Der programmierte Zelltod kann auf unterschiedlichste Weise induziert werden. AtRA löst bereits nach 30 Minuten transkriptionsunabhängig Apoptose aus. Im Vergleich dazu sollte eine analoge Methode für die hepatozellulären Karzinomzelllinien analysiert werden. Als Alternative bot sich eine rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion an.

Es wurde die Stimulation des Fas (CD95, APO-1) -Rezeptors untersucht. Dieser ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und ein etablierter Auslöser der Apoptose. Die Bindung des Fas-Liganden an den Rezeptor führt über einen Komplex zur Aktivierung von Caspase 8/10 und damit zur Initiierung der Proteolysekaskade. Analog zur atRA-Inkubation, wird auch durch Fas-Stimulation die MAPK JNK phosphoryliert.

Eine 18-stündige Inkubation mit 50µM und 100µM atRA brachte in beiden Zelllinien einen konzentrationsabhängigen Anstieg von cIAP2 und CK18-Fragmenten.

Stimulation mit 0,5 µg/ml Anti-Fas (monoklonaler Antikörper gegen Fas/CD95/APO-1-Rezeptor) konnte allerdings nur bei den HepG2-Zellen Apoptose induzieren (**Abb. 3.13**). Hep3B-Zellen zeigten weder im Western-Blot, noch in der Immunfluoreszenz (Daten nicht gezeigt) die Zeichen einer Apoptoseinduktion durch Fas-Stimulierung. Weil diese Zelllinie kaum Fas-Rezeptoren auf ihrer Membran ausbildet, war keine ligandenvermittelte Apoptose auslösbar.

Doppelstimulation mit 0,5µg/ml Anti-Fas und 50µM RA bei den HepG2-Zellen brachte eine Vermehrung der Apoptoserate. Beide Induktoren verhielten sich additiv.

Bei den Hep3B-Zellen hatte die Anti-Fas Inkubation keinen Effekt auf die atRA-Behandlung. Die Apoptose konnte im gleichen Maße ausgelöst werden.

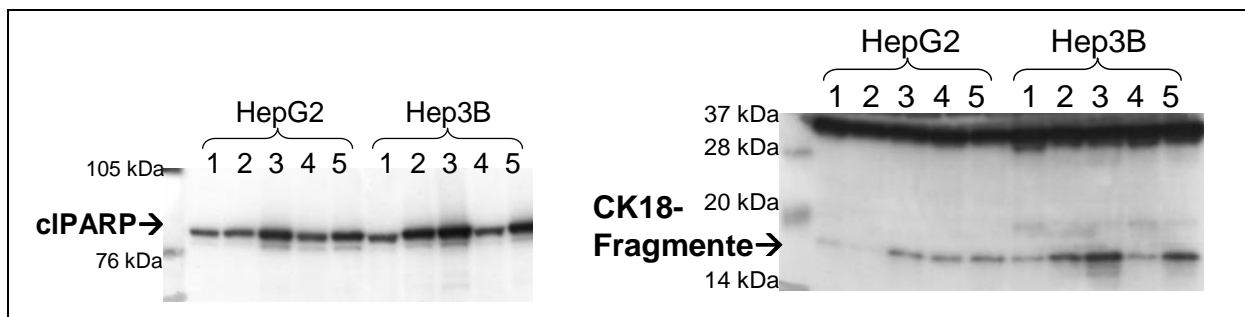


Abb. 3.13: Analyse der All-trans Retinolsäure- und Fas-Stimulation in den HepG2- und Hep3B-Zelle. Nach Kultivierung der Zellen auf 12 well Platten und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% für 24h wurden die HepG2- und Hep3B-Zellen mit 50µM und 100µM all-trans Retinolsäure für 18h inkubiert (2,3), mit 0,5µg/ml AntiFas für 18h stimuliert (4), oder mit 0,5µg/ml AntiFas und 50µM all-trans Retinolsäure für 18h zusammen inkubiert (5) und anschließend für Western-Blot Untersuchungen vorbereitet. Spaltprodukte von PARP und CK18-Fragmente weisen bei beiden Zelllinien die konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion von all-trans Retinolsäure nach. Bei den HepG2-Zellen zeigt die Inkubation mit 0,5µg/ml Anti-Fas einen schwächeren Anstieg der Apoptosemarker, der durch 50µM atRA noch gesteigert werden kann. Bei den Hep3B-Zellen weisen die Antikörper gegen cI-PARP und gespaltenes Cytokeratin 18 im Vergleich zum Leerwert nach der Stimulation mit 0,5µg/ml Anti-Fas keine Signaländerungen auf, Fas-Stimulation induziert in dieser Zelllinie keine Apoptose. (alle 18h: 1-unstimuliert, 2-50µM atRA, 3-100µM atRA, 4-0,5µg/ml AntiFas, 5-0,5µg/ml AntiFas + 50µM atRA)

3.5 Intrazelluläre ZAP90-Verteilung und Cytokeratin- Co-Lokalisation

In der Immunfluoreszenz zeigte ZAP90 in den Hep3B- und den HepG2-Zellen eine faserartige Verteilung. Eine vermutete Co-Lokalisation mit cytoskelettalen Proteinen wurde in vorhergehenden Arbeiten (Vollbrecht, 2002) verifiziert. Dabei fiel besonders die Assoziation von ZAP90 und CK18 auf. Die obigen Untersuchungen zeigten bereits die Proteolyse von CK18 und den Einsatz als Apoptose-Marker. Im Folgenden sollte nun das Verhalten von ZAP90 während der Apoptose dargestellt und eine mögliche Co-Lokalisation mit CK18 untersucht werden.

In der Immunfluoreszenz wurde dazu in vorherigen Arbeiten bereits der monoklonale Antikörper 3c gegen ein N-terminales Peptid der ZAP90 Aminosäurekette etabliert. Nach 48-stündiger Kultivierung auf Deckgläschen wurden beide Zelllinien mit dem 3c-Antikörper inkubiert. Danach wurde das ZAP90 durch einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper aus der Maus dargestellt.

Die Hep3B-Zellen zeigten unstimuliert die typischen faserartigen Formationen des ZAP90. Das Protein ließ sich in dem großflächigen Cytoplasma nachweisen. Es zeigte vor allem eine perinukleäre Verteilung mit kappenartiger Anlagerung an den Zellkern. Zur Peripherie hin nahm die Expression ab (**Abb. 3.14a**).

HepG2-Zellen zeigten unstimuliert eine starke cytoplasmatische Anfärbung des ZAP90. Die Verteilung erschien retikulär. Allerdings waren einzelne Formationen durch das zelldichte Wachstum schwer zu beurteilen (**Abb. 3.15a**).

Stimulation mit 200µM atRA induzierte Apoptose. Diese war durch die Veränderung der Zellkernmorphologie gut zu erkennen. Die Zellkerne wurden kleiner, rundeten sich ab und bildeten typische Membranblasen aus (membrane blebbing). Weiterhin schnürten sich apoptotische Körperchen ab (apoptotic bodies). Die Zelldichte wurde geringer.

Auch die Morphologie von ZAP90 änderte sich während der Apoptose zeitabhängig. In den Hep3B-Zellen kondensierte die Struktur der cytoplasmatischen ZAP90-Anfärbung. Die großflächige Verteilung schien zu zerfallen. Die perinukleäre Expression nahm stark ab und lockerte sich zur Peripherie hin auf. Nach ca. 3 Stunden wurde ein vesikuläres Bild sichtbar. Neben verminderter cytoplasmatischer ZAP90-Verteilung fand man vor allem diese bläschenartige Morphologie. Es ähnelte dem Bild des späten M30-Musters (**Abb. 3.14b,c**).

Auch die HepG2-Zellen zeigten während der Apoptose nicht mehr die retikuläre ZAP90 Expression. In den apoptotischen Zellen fiel die Degradation der faserartigen Formation auf. Statt der faserartigen Verteilung ergab die Retinolsäure-Stimulation eine vesikuläre Morphologie, die an den Abbau des CK18 erinnerte (**3.15b**).

Die gezeigten Veränderungen in der ZAP90 Expression während der Apoptose standen in Analogie zur CK18-Verteilung. Da die Co-Lokalisation in unstimulierten Zellen bereits verifiziert wurde, sollte nun das gemeinsame Vorkommen in der Apoptose untersucht werden.

Dazu wurde die Co-Immunfluoreszenz mit Doppelfärbungen gegen ZAP90 (rot) und CK18-Fragmente (grün) durchgeführt (**Abb. 3.16, Abb. 3.17**).

Der 3c- und der M30-Antikörper sind beide monoklonale Antikörper aus der Maus. Weil aber der M30-Antikörper direkt FITC-fluoreszenzmarkiert ist, konnte nach der ZAP90-Färbung auf die Fab-Fragment Blockade verzichtet werden. Die Auswertung erfolgte rechnergestützt durch das AxioCam[Carl Zeiss]-Programm. Grün- und rot-fluoreszierende Punkte gleicher Lokalisation erschienen gelb.

Unstimuliert zeigten beide Zelllinien vorwiegend die retikuläre Verteilung des rot leuchtenden ZAP90. Bei den Hep3B-Zellen sah man die Expression im Cytoplasma und die perinukleäre Anfärbung, die zur Peripherie hin abnahm. Auch in den HepG2-Zellen waren die faserartigen Formationen zu finden. Durch ein M30-Grundleuchten wiesen wenige Bereiche gelbe Fluoreszenz auf (**Abb. 3.16a, Abb. 3.17a**).

Die Zellen wurden mit 200µM atRA stimuliert. Es kam im Laufe der Apoptose zur Caspase-Proteolyse des CK18 und somit zum vesikulären Verteilungsmuster des M30.

Bei den Hep3B-Zellen zeigte sich die kondensierte retikuläre ZAP90 Expression mit auftauchendem vesikulärem Muster. Auch der M30-Antikörper zeigte in den apoptotischen Zellen das vesikuläre Muster. Bei der rechnergestützten Auswertung erschienen einige dieser bläschenförmigen Figuren gelb und wiesen damit eine Co-Lokalisation nach (**Abb. 3.16b**). Wenn ZAP90 vesikulär auftrat, war es immer assoziiert mit den CK18-Fragmenten. Daneben gab es auch nur M30 markierte Vesikel. Das Auftreten rein grüner und roter Bereiche machte eine mögliche Kreuzreaktivität der Antikörper unwahrscheinlich.

In den HepG2-Zellen erschien ein ähnliches Färbemuster. ZAP90 zeigte die bekannte Apoptosemorphologie mit faserartiger und vesikulärer Anordnung. Der

M30-Antikörper markierte die abgebauten CK18-Fragmente größtenteils bläschenartig, zu einem kleinen Teil jedoch auch retikulär. Das Übereinanderlegen zeigte eine Co-Lokalisation von faserartigen und vesikulären Strukturen (**Abb. 3.17b,c,d**). Im Gegensatz zu den Hep3B-Zellen fand man durchaus auch ausnahmslos rot angefärbte Vesikel, sowie grüne Faserformationen. Unabhängig von der Morphologie gab es demnach Bereiche isolierter ZAP90- oder M30-Expression.

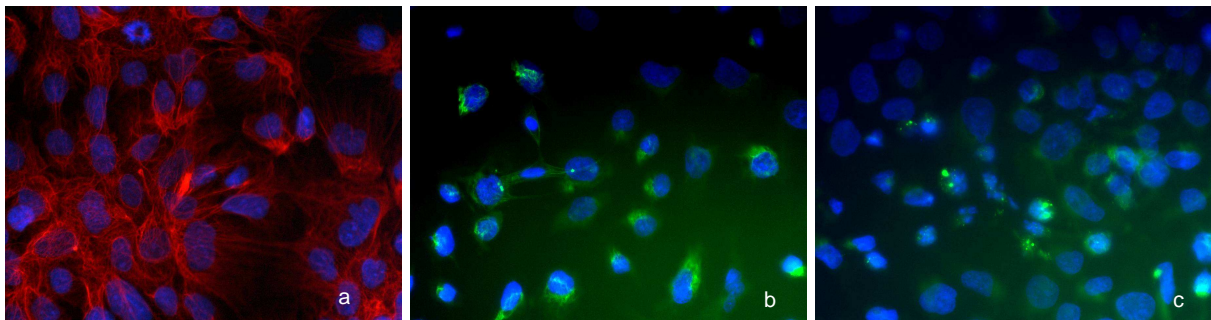


Abb. 3.14: ZAP90-Fluoreszenz während der atRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Wachstum von Hep3B-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (**a**), oder mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 1h (**b**) und 3h (**c**) stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit dem 3c-Antikörper gegen das ZAP90-Protein zeigt sich rotmarkiert in unstimulierten Hep3B-Zellen eine retikuläre, perinukleäre Morphologie im Cytoplasma (**a**). 200 μ M atRA führt nach 1h zu einer Verkleinerung der Zellkerne und zur Degradation der faserartigen ZAP90-Formationen (**b**). Nach 3-stündiger atRA-Stimulation mit 200 μ M (**c**) weisen die Zellkerne typische Apoptoseveränderungen ("bleb"-Ausbildung) auf. Auffällig ist das vesikuläre ZAP90-Verteilungsmuster während der Apoptose, das an die M30-Morphologie erinnert.

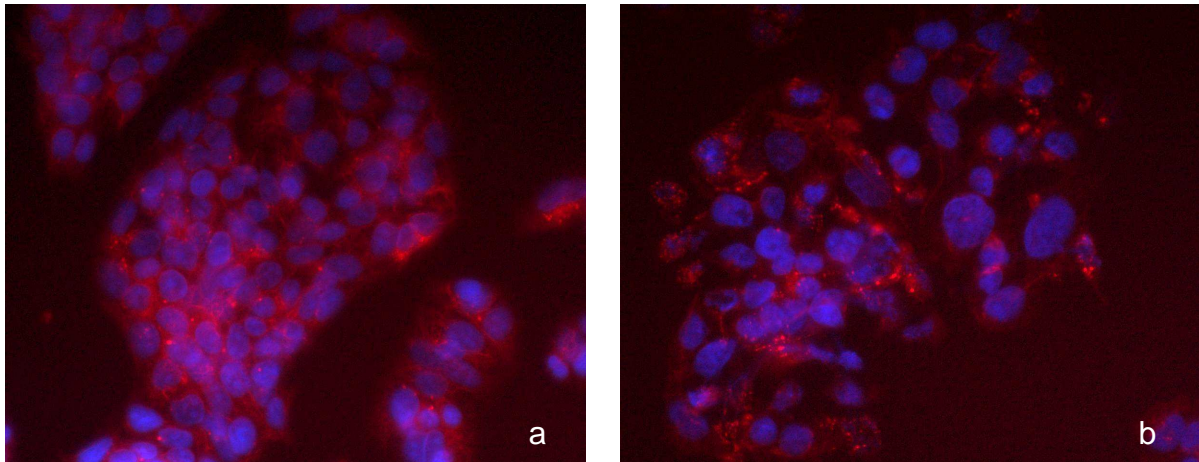


Abb. 3.15: ZAP90-Fluoreszenz während der atRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Wachstum von HepG2-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (**a**), oder mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 3h (**b**) stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Inkubation mit dem 3c-Antikörper gegen das ZAP90-Protein ist in unstimulierten HepG2-Zellen eine cytoplasmatische Verteilung faserartiger ZAP90-Formationen erkennbar (**a**). Eine 3-stündige atRA-Behandlung mit 200 μ M induziert Apoptose (**b**). Damit verschwindet auch bei dieser Zelllinie das retikuläre ZAP90-Muster, die apoptotischen HepG2-Zellen zeigen eine vesikuläre Morphologie.

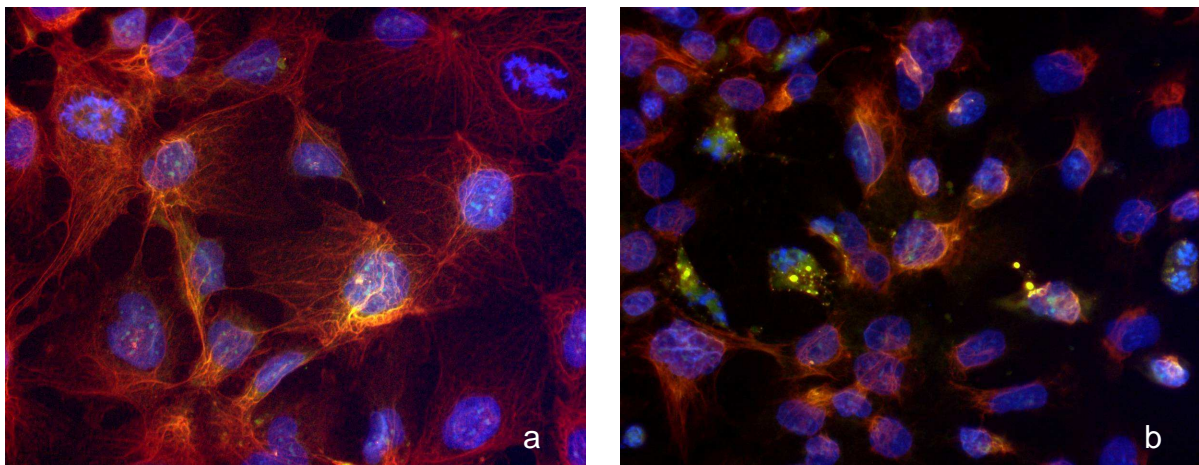


Abb. 3.16: Co-Lokalisation von M30 und ZAP90 während der atRA-induzierten Apoptose bei Hep3B-Zellen. Nach Wachstum von Hep3B-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (**a**), oder mit 200 μ M all-trans Retinolsäure für 3h (**b**) stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Doppel-Inkubation mit dem 3c-Antikörper gegen das ZAP90-Protein sowie mit M30 CytoDeath® weisen die unstimulierten Hep3B-Zellen eine faserartige ZAP90-Anfärbung (rot) im Cytoplasma auf (**a**). Die wenigen gelben Bereiche kommen durch die Übereinanderlagerung mit dem M30-Antikörper zustande, der auch im Leerwert eine geringe Grundaktivität zeigt. Eine 3-stündige atRA-Behandlung mit 200 μ M induziert Apoptose (**b**). Dies führt zur Abnahme der faserartigen ZAP90-Verteilung (rot), M30 lässt ein vesikuläres Muster (grün) erkennen. Darüber hinaus sieht man eine Assoziation von M30 mit ZAP90 (gelb) in den bläschenförmigen Strukturen.

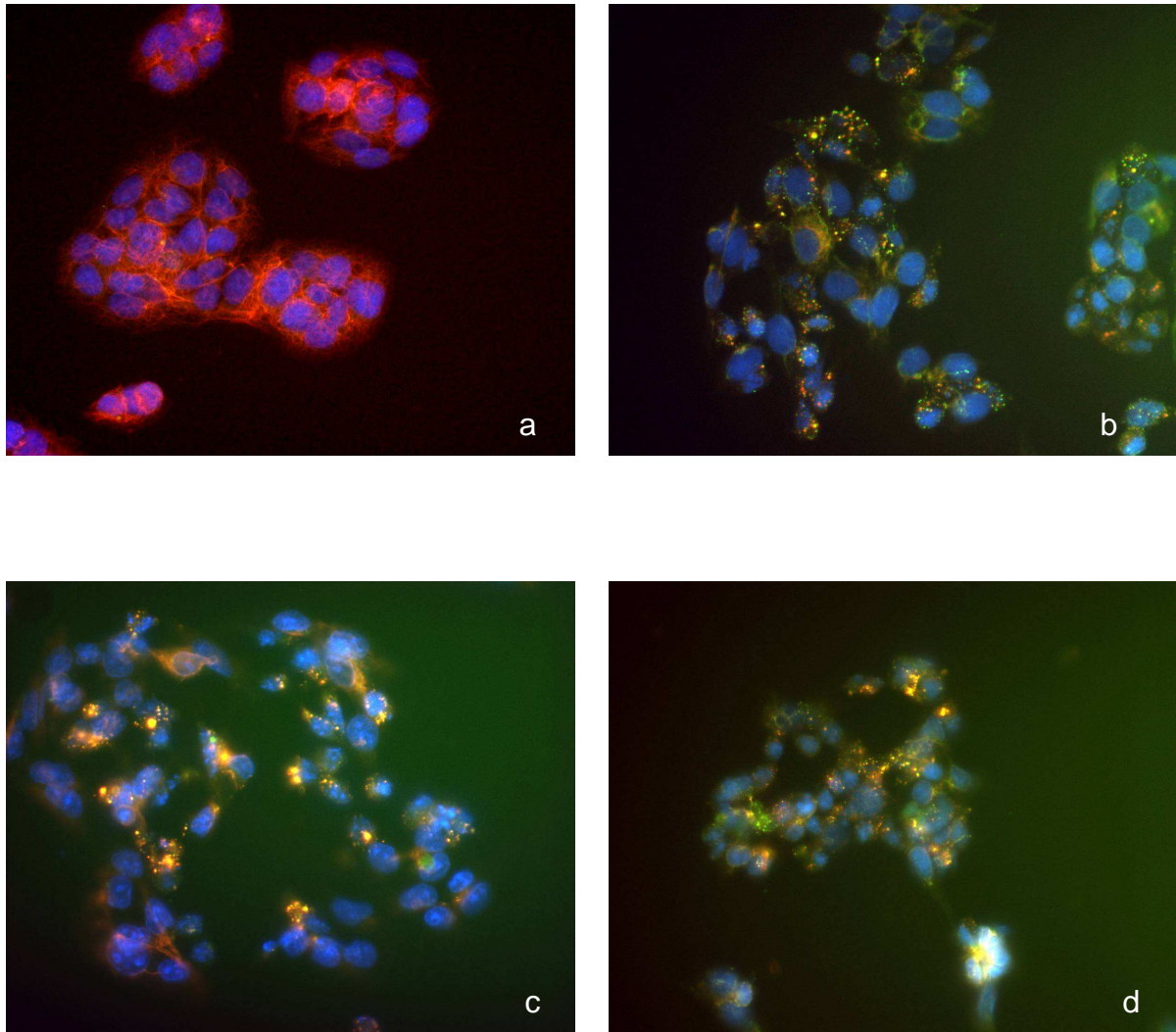


Abb. 3.17: Co-Lokalisation von M30 und ZAP90 während der atRA-induzierten Apoptose bei HepG2-Zellen. Nach Wachstum von HepG2-Zellen auf Deckgläschen und anschließender FCS Reduktion auf 0,5% im Nährmedium für 24h wurden die Zellen unbehandelt fixiert (**a**), oder mit 200µM all-trans Retinolsäure für 3h (**b**) und 5h (**c,d**) stimuliert und danach fixiert. Nach der Kernfärbung mit bisBenzimide und anschließender Doppel-Inkubation mit dem 3c-Antikörper gegen das ZAP90-Protein sowie mit M30 CytoDeath® weisen die unstimulierten HepG2-Zellen eine retikuläre ZAP90-Anfärbung (rot) im Cytoplasma auf, es gibt kaum M30-Fluoreszenz (**a**). Eine 3-stündige atRA-Behandlung mit 200µM induziert Apoptose (**b**). Es zeigt sich eine Abnahme der faserartigen ZAP90-Formationen und ein vesikuläres Verteilungsmuster. M30 weist ein ähnliches Bild auf, die gelben Bereiche weisen auf eine Co-Lokalisation hin. Nach 5h erscheinen in den HepG2-Zellen fast nur noch vesikuläre Bereiche von deutlicher Co-Lokalisation (**c**), einzelne retikuläre Muster sind auf die ZAP90-Expression zurückzuführen. Die Darstellung beider Proteine ist möglich (**d**): das Auftreten von roter ZAP90-Abfärbung, grüner M30-Fluoreszenz und gelben Bereichen der vermuteten Co-Lokalisation in einem Bild macht eine Kreuzreaktion zwischen den Antikörpern unwahrscheinlich.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Retinolsäure-induzierte Apoptose und die damit verbundenen Signaltransduktionswege in hepatozellulären Tumorzelllinien. Neue Therapiestrategien gegen tumorrelevante Signalkaskaden haben bereits Einzug in die klinische Tätigkeit erhalten („targeted therapy“) und werden im Verlauf dieser Arbeit dargestellt.

Des Weiteren stehen die morphologischen Veränderungen von Cytokeratin 18 und ZAP90 während der Apoptose im Zentrum der vorliegenden Untersuchungen. Aus der strukturellen Interaktion dieser Proteine ergibt sich eine potentielle Bedeutung für die Diagnostik und Therapiekontrolle des hepatozellulären Karzinoms. Am Ende der Arbeit wird eine mögliche Funktion von ZAP90 in der Hepatokarzinogenese diskutiert.

4.1 Retinolsäure induziert Apoptose

In der onkologischen Therapie solider und hämatologischer Malignome stehen Retinoide und Vitamin A - Derivate zur Verfügung. Muto *et al.* (1996, 1999) wiesen nach, dass eine oral applizierte Therapie mit azyklischem Retinoid (600mg/Tag) nach chirurgischer Resektion die Rezidivrate des hepatozellulären Karzinoms signifikant senkt. Als molekularer Mechanismus der antineoplastischen Wirkung von Retinolsäure wird neben der Genregulation die transkriptionsunabhängige Apoptoseinduktion diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Retinoide auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von hepatozellulären Tumorzellen untersucht werden. Die Retinolsäure (RA) ist eine aktive Form des Vitamins A. In den Versuchen wurden die beiden Isoformen all-trans und 9-cis RA verwendet. Die hepatozellulären Tumorzelllinien Hep3B und HepG2 wurden jeweils mit all-trans und 9-cis RA stimuliert. Beide Wirkformen konnten in diesen humanen Zelllinien abhängig von der verwendeten Dosis (25-200µM atRA, 5-100µM cisRA) und der Inkubationszeit (30 Minuten bis 18 Stunden) Apoptose induzieren.

Der Apoptosenachweis gelang durch Untersuchungen des Zelllysats anhand von Western-Blot Analysen. Dabei untersuchten wir Substrate der Caspase-vermittelten Proteolyse. Unter anderem zeigte die Spaltung des DNS-Reparaturenzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) die Apoptose an. Zudem wiesen beide hepatozelluläre Karzinomzelllinien nach atRA/cisRA-Stimulation in der Immunfluoreszenzhistologie morphologische Zeichen der Apoptose auf.

4.2 Analyse der Retinolsäure-vermittelten Apoptose

Die Apoptoseinduktion durch eine atRA/cisRA-Stimulation wurde für beide hepatozelluläre Karzinomzelllinien verifiziert. Die Mechanismen, die der Apoptoseinduktion durch Retinolsäure zu Grunde liegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. In vorhergehenden Untersuchungen (Fürst, 2008) wurde nachgewiesen, dass die Retinolsäure in HepG2-Zellen transkriptionsunabhängig Apoptose induzieren kann. Dabei löste atRA Caspase-abhängig unter anderem durch Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38 den programmierten Zelltod aus. Die all-trans Retinolsäure-vermittelte Apoptose und die beteiligten Signaltransduktionskaskaden wurden in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert.

4.2.1 FCS reduziert die Retinolsäure-vermittelte Apoptose

Fetales-Kälber-Serum (FCS) ist ein Bestandteil des Nährmediums beider Zelllinien. Die Zellen wurden für die Versuche insgesamt 48 Stunden kultiviert, bevor sie jeweils mit Retinolsäure inkubiert wurden. Die ersten 24 Stunden erhielten sie ein Medium mit einem 10%igen FCS Anteil. Um Apoptose induzieren zu können, wurde für die nächsten 24 Stunden ein 0,5%iges Nährmedium eingesetzt.

Wurde die FCS-Konzentration des Nährmediums konstant bei 10% gehalten, so führte das zu einer reduzierten Retinolsäure-vermittelten Apoptose. Falasca *et al.* (1999) konnten für atRA zwar eine signifikante Wachstumshemmung bei den HepG2-Zellen nachweisen, aber keine Apoptoseinduktion. Erklären könnte das zum einen die geringer eingesetzte atRA-Konzentration von 5µM, zum anderen aber auch

das fehlende Herabsetzen der FCS-Konzentration im Medium. Die atRA-induzierte Apoptose ist demnach abhängig von der langfristigen FCS-Stimulation.

Unsere Versuchsbedingungen zeigen, dass es zur Apoptoseinduktion durch all-trans Retinolsäure erforderlich ist, mögliche antiapoptotische Signalwege zu reduzieren. Über Wachstumsfaktoren kommt es unter anderem zur Aktivierung von *Survival*-Signalwegen wie der p44/42MAPK- oder AKT- Kaskade (Mitsui *et al.*, 2001). Deshalb galt es im Folgenden, beteiligte Signalkaskaden während der atRA-vermittelten Apoptose zu untersuchen.

4.2.2 Die Aktivität der p44/42-MAP-Kinase wird durch all-trans Retinolsäure nicht beeinflusst, die Stimulation der p44/42-MAP-Kinase schwächt die Retinolsäure-vermittelte Apoptose ab

Die Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase führt in vielen Zelllinien zu Wachstum und Differenzierung. Durch Mitogene stimuliert nimmt diese MAP-Kinase eine antagonistische Rolle zu JNK und p38 ein (Xia *et al.*, 1995).

In HCC-Biopsaten und hepatozellulären Karzinomzelllinien wurde eine gesteigerte p44/42-Expression nachgewiesen (Schmidt *et al.*, 1997, Ito *et al.*, 1998, Huynh *et al.*, 2003). Bei den HepG2-Zellen konnte in den vorliegenden Untersuchungen anhand von Western-Blot Analysen der hohe Phosphorylierungsgrad der p44/42-MAP-Kinase bestätigt werden.

Eine Hemmung der p44/42-MAP-Kinase durch all-trans Retinolsäure wurde in den HepG2-Zellen nicht nachgewiesen. Die p44/42-Phosphorylierung im Western-Blot war unabhängig von einer 30-minütigen bis 2-stündigen atRA Inkubation. In der transkriptionsunabhängigen, atRA-induzierten Apoptose scheint demnach die Inhibition dieses Signalwegs in den HepG2-Zellen keine wesentliche Rolle zu spielen.

Andererseits konnten Matsushima-Nishiwaki *et al.* (2003) durch azyklische Retinolsäure die Aktivität der p44/42-MAP-Kinase in humanen HCC-Zellen vermindern. Dies wurde vor allem durch die 24-stündige Stimulation mit der Retinolsäure und dessen Wirkung auf den RXR- α Rezeptor erklärt. In hepatozellulären Karzinomzelllinien wird dieser durch die p44/42-MAP-Kinase

phosphoryliert und damit inhibiert. Das Retinoid soll die Suppression der Transkription aufheben.

Durch selektive Inhibition der p44/42-MAP-Kinase konnte Apoptose in HepG2-Zellen ausgelöst werden (Mitsui *et al.*, 2001). Bei der Stimulation mit PD98059, einem MAPK-Inhibitor, gelang die Induktion des programmierten Zelltods. Weiterhin war es möglich, durch Co-Stimulation von PD98059 und all-trans Retinolsäure die Apoptose in HepG2-Zellen zu maximieren (Fürst, 2008).

Umgekehrt bestätigte sich in unseren Versuchen die Vermutung, dass eine Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase die Apoptose abschwächt. In den vorliegenden Untersuchungen führte eine 30-minütige Präinkubation mit dem Phorbolster TPA (Tetradecanoylphorbolacetat) zu einer Aktivierung des p44/42-MAP-Kinase-Signalwegs. Während sich der Gehalt des Gesamt-p44/42 in den HepG2-Zellen nicht änderte, kam es in den TPA behandelten Zellen zu vermehrter Phosphorylierung von p44/42 (Thr202/204). Daneben zeigte sich durch die TPA-Präinkubation eine Reduktion der atRA-vermittelten Apoptose.

Wichtiger Angriffspunkt scheint bei vielen TPA-vermittelten Mechanismen die Proteinkinase C (PKC) zu sein (Kaneki *et al.*, 1999). Durch die PKC-Aktivierung beeinflusst TPA die Regulation der MAP-Kinasen. Eine PKC abhängige p44/42-Induktion konnte z.B. in ischämischen Hepatozyten nachgewiesen werden (Gao *et al.*, 2004).

Insgesamt ist davon auszugehen, dass in den TPA-präinkubierten HepG2-Zellen eine PKC abhängige p44/42-Aktivierung zu einer reduzierten Apoptoserate führt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Stimulation der p44/42-MAP-Kinase die Retinolsäure-vermittelte Apoptose abschwächt.

4.2.3 All-trans Retinolsäure inhibiert den AKT-Survival-Signalweg

Der PI3K/AKT-Signalweg ist an der Entwicklung maligner Transformationen beteiligt. AKT verhindert über verschiedene Prozesse, wie Caspase 9- und Bad- Inhibition oder Aktivierung von NF- κ B, die Apoptose (Nicholson und Anderson, 2002). In der

hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 ist die AKT-Aktivität deutlich gesteigert (Mitsui *et al.*, 2001).

Folglich sollte die Wirkung der all-trans Retinolsäure auf den AKT-Signaltransduktionsweg untersucht werden. In den Western-Blot Analysen zeigte sich, dass der Gehalt des phosphorylierten AKTs (Ser473) in den für 6 Stunden mit 100µM all-trans Retinolsäure stimulierten HepG2-Zellen abnahm. Gleichzeitig wurde dabei in den HepG2-Zellen eine Apoptoseinduktion nachgewiesen.

Dass eine Hemmung des AKTs zur Apoptose führt, beweisen unsere Versuche mit dem PI3K-Inhibitor LY294002. Die 30-minütige Inkubation mit 50µM LY294002 zeigte einen Anstieg der Apoptosemarker in den Western-Blot Analysen. Auch Huynh *et al.* (2003) konnten durch eine PI3K-Inhibition mittels LY294002 in Hep3B- und HepG2-Zellen den programmierten Zelltod auslösen. Dieses lässt vermuten, dass all-trans Retinolsäure unter anderen über phAKT-Inhibition Apoptose induziert. Wurden die mit LY294002-präinkubierten HepG2-Zellen in unseren Versuchen zusätzlich mit all-trans Retinolsäure co-stimuliert, verstärkte sich in den Western-Blot Analysen die PARP-Spaltung.

Durch die Blockierung von ATP im katalytischen Zentrum der PI3K beeinflusst LY294002 zentrale Signalwege (Vlahos *et al.*, 1994). Es werden verschiedene Wachstumsfaktor-vermittelte Transduktionskaskaden unterbunden. Damit ist LY294002 kein spezifischer AKT-Inhibitor. Somit konnte zur Rolle des AKT-*Survival*-Signalwegs unter diesen Versuchsbedingungen nur bedingt Aussagen getroffen werden.

Um die Bedeutung einer AKT-Inhibition für die Apoptose zu prüfen und Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu ermöglichen, wurde dessen Translation gehemmt. Die siRNA-AKT-Transfektion führte in den vorliegenden Versuchen bei den HepG2-Zellen zu einer verminderten AKT- und phAKT-Expression. Im Western-Blot wiesen die Zellen nach AKT-Translationshemmung einen Anstieg der Apoptosemarker auf. Im Vergleich zur atRA-Stimulation war durch die Hemmung von funktionellem AKT mittels siRNA nur eine schwache Apoptoseauslösung möglich. Diese konnte durch eine zusätzliche Retinolsäure-Inkubation weiter gesteigert werden.

Der *AKT-Survival*-Signalweg scheint bei der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 eine wichtige Rolle in der anti-apoptotischen Regulation einzunehmen. Eine Überexpression von AKT ist in vielen Malignomen nachgewiesen worden und spielt auch eine bedeutende Rolle in der Hepatokarzinogenese (Testa und Bellacosa, 2001). AtRA inhibiert die AKT-vermittelte Signalkaskade.

Es sind aber bei der Retinolsäure-vermittelten Apoptose neben der Hemmung des *AKT-Survival*-Signalwegs möglicherweise noch weitere proapoptotische Transduktionskaskaden von Bedeutung.

4.2.4 Untersuchung der Fas-abhängigen Apoptose

Die TNF-Rezeptorfamilie umfasst über 20 Proteine und ist an der Regulation verschiedener Prozesse wie Differenzierung, Immunreaktion und Zelltod beteiligt (Walczak und Krammer, 2000). Der Fas (CD95, APO-1) -Rezeptor ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und kann über eine Komplexbildung (DISC) unter anderem durch Aktivierung von Caspase 8/10 und JNK Apoptose induzieren. Deshalb sollte eine Beteiligung dieses apoptotischen Signalwegs bei hepatozellulären Karzinomzelllinien geprüft werden.

In unseren Versuchen konnte die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Fas-Rezeptor nur in den HepG2-Zellen Apoptose vermitteln. Während Retinolsäure in beiden hepatozellulären Karzinomzelllinien Apoptose auslöste, zeigten die Hep3B-Zellen weder im Western-Blot, noch in der Immunfluoreszenz die Zeichen einer Apoptoseinduktion durch Fas-Stimulierung.

Bis zu 80% der HepG2-Zellen bilden Fas-Rezeptoren auf ihrer Membran aus, während diese nur bei etwa 3% der Hep3B-Zellen detektiert werden (Müller *et al.*, 1997). Im Gegensatz zur HepG2-Zelllinie, die Wildtyp p53 und das Retinoblastoma Protein exprimiert, sind in Hep3B-Zellen beide Gene von inaktivierenden Mutationen betroffen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Gerade p53 spielt für die Fas-induzierte Apoptose eine wesentliche Rolle.

Retinolsäure löste in den Hep3B-Zellen unabhängig von der Anti-Fas – Inkubation Apoptose aus. In den HepG2-Zellen konnte atRA die Wirkung der Fas-Stimulation weiter steigern.

Verschiedene Studien wiesen nach, dass das Fas/ CD95/ APO-1 -System eine wichtige Rolle in etablierten Tumortherapiemodellen spielt (Debatin und Kramer, 2004). Die eingesetzten Zytostatika führten zu einem erhöhten Fas-L (Fas-Ligand) - Spiegel, der autokrin oder parakrin über den Fas-Rezeptor Apoptose auslöste. Außerdem wurde eine Zunahme der Rezeptorexpression auf der Membranoberfläche nachgewiesen. Houghton *et al.* (1997) beschrieben z.B. eine Beteiligung des CD95-Systems an dem durch 5-Fluorouracil ausgelösten Zelltod in der Therapie des kolorektalen Karzinoms.

Zytostatika wie Bleomycin, Cisplatin und Methotrexat steigerten die Expression der Fas-Rezeptoren und Fas-Liganden in HepG2-Zellen (Müller *et al.*, 1997). Induzierte Apoptose konnte unter diesen Versuchsbedingungen durch eine Blockade des Fas-Signalwegs inhibiert werden.

Allerdings wurden bei einigen Malignomen eine verminderte Expression und Mutationen der Fas-Rezeptoren beschrieben (Debatin und Kramer, 2004). So zeigten Natoli *et al.* (1995), dass verschiedene HCC-Zelllinien resistent gegenüber der Fas-induzierten Apoptose waren. Die Fas- und Fas-L Expression in humanem HCC-Gewebe nahmen abhängig vom Dysplasiegrad ab. Möglicherweise stellt dieses einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Zellpopulationen dar. Durch ein reduziertes Apoptosepotential können maligne Klone verstärkt proliferieren.

In der ligandenvermittelten Apoptose sind demnach einige Variabilitäten zu finden. Im Gegensatz dazu besitzen die Retinoide als lipophile Substanzen eine hohe Zellpermeabilität. Sie können leicht ins Zytoplasma penetrieren und benötigen keinen Carrier. Unabhängig von der Rezeptorexpression auf der Membranoberfläche kann die Retinolsäure dadurch Apoptose induzieren.

4.2.5 Transduktionskaskaden der Retinolsäure-vermittelten Apoptose

Die beteiligten Signalkaskaden bei der transkriptionsunabhängigen Induktion der Apoptose durch Retinoide werden zunehmend verstanden. Obwohl einheitliche Rezeptor-Zuordnungen fehlen, ist nach der Analyse unserer Versuche eine direkte Aktivierung von proapoptotischen Kinasen und die Inhibition von *Survival-*

Signalwegen durch all-trans Retinolsäure wahrscheinlich. Zellkernrezeptoren scheinen darauf keinen Einfluss zu haben. Ocker *et al.* (2004) wiesen nach, dass eine Apoptoseauslösung mit einem synthetischen Retinoid (CD271) unabhängig von der Aktivität der nukleären Rezeptoren RAR (retinoic acid receptor) und RXR (retinoic X receptor) möglich war. Es wird eine direkte Interaktion von Retinoiden mit Mitochondrien und Stresskinasen über einen bisher nicht identifizierten Mechanismus vermutet (Ocker *et al.* 2004). Unabhängig von der Retinolsäure-vermittelten Genregulation werden demnach proapoptotische Signaltransduktionskaskaden induziert.

Anhand vorliegender und vorhergehender Untersuchungen (Fürst, 2008) konnte gezeigt werden, dass die RA-induzierte Apoptose in HepG2-Zellen transkriptionsunabhängig, über die Aktivierung von JNK und p38MAPK, sowie durch die Inaktivierung des AKT-*Survival*-Signalwegs und Caspase-abhängig verläuft.

In unseren Versuchen war die Phosphorylierung der Onkogenese-assoziierten p44/42-MAP-Kinase unabhängig von der atRA-Stimulation. Zudem zeigte die Aktivierung des p44/42-MAP-Kinase-Signalwegs eine Abschwächung der Retinolsäure-vermittelten Apoptose.

Es konnte für verschiedene Zytostatikatherapien gezeigt werden, dass der p44/42-Signalweg an der Ausbildung von Resistenzen beteiligt ist (Fan und Chambers, 2001). In HCC-Biopsaten wurde eine gesteigerte p44/42-Expression nachgewiesen (Schmidt *et al.*, 1997). Ito *et al.* (1998) und Huynh *et al.* (2003) bestätigten eine erhöhte p44/42-Aktivität in diversen HCC-Zelllinien. Die Wirksamkeit der Retinoide in der HCC-Therapie könnte dementsprechend durch eine p44/42-MAP-Kinase-Inhibition gesteigert werden.

Zudem ist die Hypervaskularisation beim HCC ein bedeutendes klinisches Merkmal. Deshalb stellt eine Behandlung mit Angiogenesehemmern wie VEGF (vascular endothelial growth factor)-Rezeptorantagonisten einen erfolgversprechenden Ansatz dar (Pang und Poon, 2007). Folgedessen könnten Kombinationstherapien mit Inhibition der Neovaskularisation und tumorrelevanter MAP-Kinase-Signalkaskaden den Retinolsäure-Effekt maximieren.

4.3 Multimodale Therapiekonzepte des hepatozellulären Karzinoms

4.3.1 HCC-Therapiestrategien

In der Hepatokarzinogenese werden zunehmend beteiligte, zelluläre Signalwege erkannt. Durch Etablierung neuer Substanzen, die in tumorrelevante Signalkaskaden eingreifen, ergeben sich daraus erweiterte Therapieoptionen (Pang und Poon, 2007). Neue Strategien richten sich gegen spezifische molekulare Strukturen („targeted therapy“).

Für Patienten mit fortgeschrittenem HCC konnte die Wirksamkeit des oralen Multikinaseinhibitors Sorafenib nachgewiesen werden (Llovet *et al.*, 2007). Sorafenib richtet sich gegen zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege (El-Serag *et al.*, 2008). Zum einen inhibiert es die Proteinkinase Raf (**R**as **a**ctivated **f**actor) und damit die p44/42-MAP-Kinase-Signalkaskade. Zusätzlich zeigt Sorafenib eine Aktivität gegen einige Rezeptor-Tyrosinkinasen, die für die Neoangiogenese wichtig sind. Dabei handelt es sich um den VEGF (**v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor) – Rezeptor, den PDGF (**p**latelet **d**erived **g**rowth **f**actors) – Rezeptor und die FLT3 (**F**MS like tyrosine kinase 3). Deshalb wird Sorafenib auch als Multikinase-Inhibitor mit dualem Wirkungsmechanismus bezeichnet.

In einer Placebo-kontrollierten Phase III-Studie (SHARP-Trial) ergab die systemische Behandlung eine signifikante Erhöhung der mittleren Überlebenszeit für die Sorafenib-Gruppe (Llovet *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse dieser Phase III-Studie führten Ende 2007 in den USA und der EU zur Zulassung von Sorafenib in der systemischen Therapie des HCC. Sorafenib ist mittlerweile in einen Algorithmus für die Differenzialtherapie des HCC integriert (**siehe Abb. 4.1**): Die BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer)-Klassifikation, die eine Kombination aus morphologischen Kriterien und der Leberfunktion umfasst, dient einer stadiengerechten Behandlung des HCCs (El-Serag *et al.*, 2008). Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium C mit Gefäßinfiltration oder extrahepatischen Metastasen sollten Sorafenib erhalten.

Damit ist Sorafenib der neue Referenzstandard in der systemischen Therapie des fortgeschrittenen HCCs (Llovet *et al.*, 2008).

Sorafenib inhibiert Signalkaskaden, die für die Progression des hepatozellulären Karzinoms von Bedeutung sind. Ein bereits manifestes HCC kann so an weiterem Fortschreiten gehindert werden (El-Serag *et al.*, 2008). Es wird eine Proliferationshemmung und damit eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens erreicht.

Retinolsäure induziert in hepatozellulären Tumorzelllinien Apoptose. Retinoide könnten durch diese antineoplastische Wirkung zu einer Karzinomrejektion führen.

Eine potentielle Kombination von Sorafenib und Retinolsäure wäre in der Behandlung des fortgeschrittenen HCCs denkbar. Dahinter steht die Rationale, verschiedene molekularen Wirkmechanismen zu nutzen: Proliferationshemmung, angiostatische Wirkung und Apoptoseinduktion.

Klinische Studien sollten sich den Kombinationen von zielgerichteten Therapien („targeted therapies“) und der Frage der multimodalen Konzepte zuwenden. Behandlungsmodelle im Sinne einer Adjuvans nach lokoregionären Ablationsverfahren (perkutane Ethanolinjektion, Radiofrequenz-Thermoablation, transarterielle Chemoembolisation) wären ebenfalls denkbar.

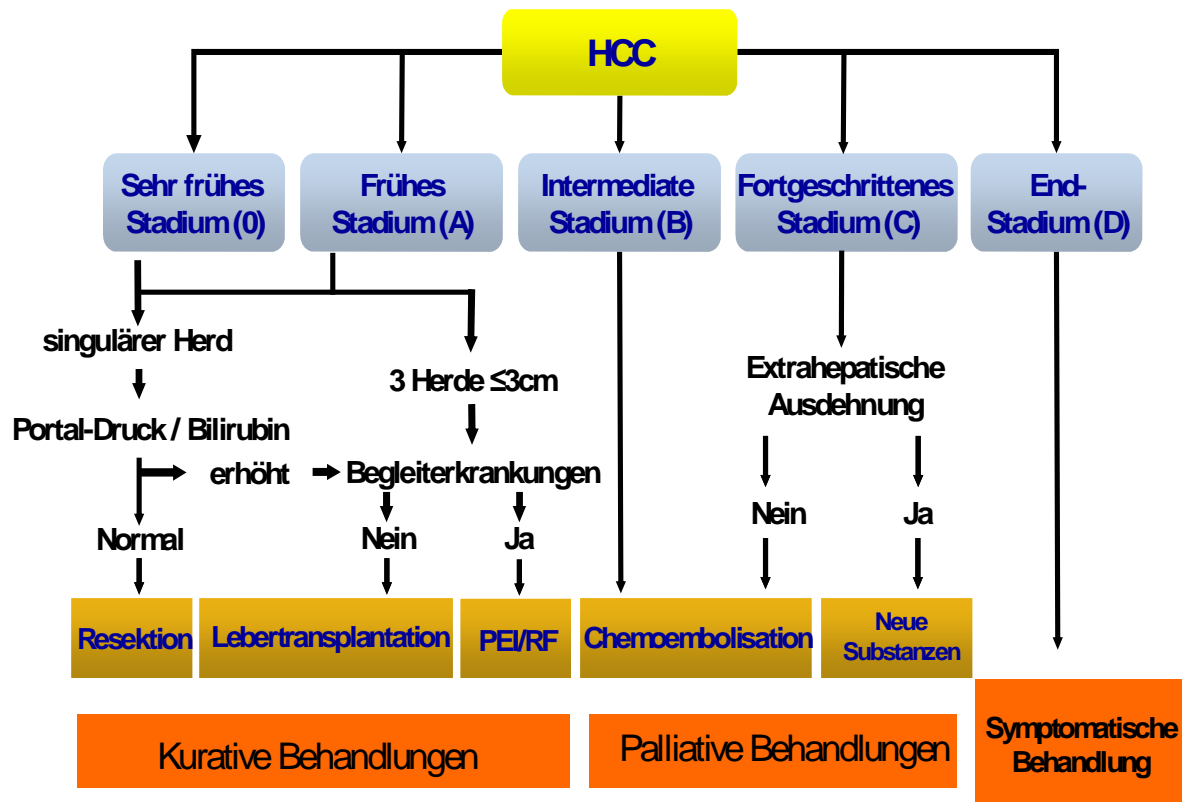


Abb. 4.1: HCC-Therapie-Algorithmus nach der BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer)-Klassifikation (modifiziert nach El-Serag et al., 2008). (PEI = perkutane Ethanol-Injektion, RF = Radiofrequenzablation)

4.3.2 HCC-Sekundärprävention

Neben der Entwicklung neuer Therapieverfahren kommt der HCC-Prävention besondere Bedeutung zu. Außer der Primärprävention (z.B. Hepatitis B Impfung) ist die HCC-Sekundärprävention zunehmend wichtig. Die Effektivität von IFN- α (Interferon- α) zur Prävention des hepatozellulären Karzinoms ist bei Patienten mit chronischer Hepatitis B/C belegt (El-Serag und Rudolph, 2007).

Die Karzinogenese des HCC verläuft meist über langjährige Inflammations- und Regenerationsprozesse. Es entsteht zu 90% auf dem Boden einer Zirrhose und tritt dabei multilokulär und metachron auf (Fattovich et al., 2004). Bereits bei Hepatozyten lassen sich im Rahmen einer chronisch viralen Hepatitis und in prämaligen Zellen dysplastischer Knoten molekulare Veränderungen wie z.B. eine

gesteigerte p44/42-MAP-Kinase-Expression nachweisen. Die maligne Transformation dieser Läsionen resultiert dabei sowohl aus Veränderungen auf genetischer (Allelverlust, Mikrosatelliteninstabilität) als auch auf epigenetischer (DNA-Methylierungen, Histondeacetylierungen) Ebene (Farazi und DePinho, 2006). Wegen des Karzinomrisikos bei Zirrhose limitieren neue HCC-Läsionen nach einer erfolgreichen chirurgischen oder lokalablativen Behandlung die Prognose des Patienten. Die Rezidivrate nach einer Resektion liegt bei über 50% in fünf Jahren (El-Serag *et al.*, 2008). Deshalb kommt der HCC-Sekundärprävention eine besondere Bedeutung zu.

Sowohl Laborversuche mit verschiedenen Leberzelllinien als auch Tierexperimente wiesen nach, dass Retinolsäure die Anzahl neoplastischer Läsionen reduzieren kann (Okuno *et al.*, 2004). In transformierten Zellen wurde durch Apoptoseinduktion eine „de novo“ HCC-Ausbildung der prämaligen Zellklone inhibiert (Kojima *et al.*, 2004). Außerdem wurde nach Retinolsäure-Inkubation eine Redifferenzierung von HepG2-Zellen beobachtet (Falasca *et al.*, 1999). Ähnliches beschreiben Kojima *et al.* (2004): Retinolsäure-stimulierte HCC-Zellen erlangen phänotypische Merkmale normaler Hepatozyten, wie verminderte Telomeraseaktivität und gesteigerte Albuminsynthese. In klinischen Studien wurde bei Patienten mit einer Zirrhose das lectinreaktive AFP (AFP-L3) im Serum als Zeichen von prämaligen oder malignen Leberzellen getestet. Es zeigte sich eine Reduktion des AFP-L3 Serumspiegels bei Personen mit oral applizierten azyklischem Retinoid, während eine Reduktion von AFP-L3 in der Placebogruppe nicht beobachtet werden konnte (Kojima *et al.*, 2004).

Deswegen wird ein Einsatz von azyklischem Retinoid in der Chemoprävention des hepatozellulären Karzinoms erwogen. Das Modellsystem der „klonalen Deletion“ beschreibt einen möglichen therapeutischen Ansatz mit Retinolsäure bei malignen oder prämaligen Hepatozyten (Okuno *et al.*, 2004).

Apoptoseinduktion und Redifferenzierung können für die Deletion maligner Klone in der Leber verantwortlich sein und bilden damit die Grundlage für den von Muto *et al.* (1996, 1999) postulierten Einsatz der Retinoide in der Rezidivprophylaxe des hepatozellulären Karzinoms. Anhand dieser klinischen Studien (doppelblind und placebokontrolliert) wurde der chemopräventive Effekt durch azyklisches Retinoid nach kurativer Resektion eines hepatozellulären Karzinoms bewiesen.

4.4 CK18 als Apoptosemarker

Der Nachweis Retinolsäure-induzierter Apoptose erfolgte in den vorliegenden Untersuchungen durch die cPARP-Bestimmung (cleaved Poly-ADP-Ribose-Polymerase) im Western-Blot. Das DNS-Reparaturenzym PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) ist ein Substrat der Effektorcaspase 3 und wird durch deren Spaltung inaktiviert (Chang und Yang, 2000). Neben dem Abbau von Reparaturenzymen spalten die Caspasen auch Cytokeratin 18 (Caulin *et al.*, 1997). Dadurch werden die Fragmentierung der Zellen sowie eine spätere Phagozytose ermöglicht. In all-trans und 9-cis Retinolsäure stimulierten HepG2- und Hep3B-Zellen wiesen wir die Spaltung von CK18 sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch im Zelllysat durch Western-Blot Analysen nach.

In den vorliegenden Untersuchungen war es möglich, die apoptosespezifischen Fragmente des abgebauten CK18 immunhistochemisch darzustellen: Um die hochpolymerisierten Keratine in der Apoptose zu lösen, unterliegen die Typ I Keratine einer Spaltung (Ku *et al.*, 1997). CK18 wird bereits in der frühen Apoptose nach etwa 30 Minuten im DALD-Motiv gespalten. Dadurch wird an Asp396 eine Bindungsstelle geschaffen, die als Epitop für den M30-Antikörper (M30 CytoDeath®) dient (M30 Neoantigen). Nach etwa zwei Stunden kommt es zur Spaltung im VEVD-Motiv an Asp237. Die CK18-Fragmente bleiben anfangs noch an ihrem Interaktionspartner CK8 gebunden, welches nicht gespalten wird. Das M30-Verteilungsmuster bleibt retikulär. Erst nach ca. 3 Stunden werden die gespaltenen CK18-Fragmente in Lysosome aufgenommen. Die M30-Färbung erscheint vesikulär. Der in der Immunfluoreszenz eingesetzte M30-Antikörper detektiert damit frühzeitig Apoptose (Malhi und Gores, 2008).

Die CK18-Spaltung verhält sich zeitlich analog zur Proteolyse von PARP (Ku *et al.*, 1997). Die Messung der spezifischen CK18-Fragmente bietet als Nachweis der frühen Apoptose eine Alternative zum etablierten cPARP-System.

CK18-Spaltprodukte werden während der Apoptose nach extrazellulär abgegebenen (Sheard *et al.*, 2002) und sind dann im Patientenblut durch ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) zu detektieren. CK18-Fragmente sind dadurch im Serum mit dem kommerziellen Antikörper M30 CytoDeath® nachweisbar (Malhi und Gores,

2008). Hiermit lässt sich die Caspase-Aktivität in Hepatozyten und dadurch die Apoptose, dargestellt durch CK18-Fragmente, indirekt im Serum quantifizieren.

Laborchemisch konnte Apoptose bei verschiedenen Leberkrankungen durch den Serumnachweis der CK18-Spaltung bereits konstatiert werden. So sind bei der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis CK18-Fragmente abhängig vom Ausmaß der Erkrankung nachzuweisen (Wieckowska *et al.*, 2006). Durch Serumanalysen von CK18 mittels ELISA ist es möglich, die Progression dieser Lebererkrankung zu bestimmen (Malhi und Gores, 2008).

Damit bietet sich die Analyse von gespaltenem CK18 im Serum als nichtinvasives, diagnostisches Verfahren an. Als Biomarker weisen die CK18-Spaltungsprodukte Apoptose in der Leber nach. Die Bestimmung von CK18-Fragmenten im Serum eignet sich möglicherweise auch zum Apoptosenachweis beim hepatozellulären Karzinom. Die Quantifizierung von gespaltenem CK18 könnte als Monitor für das Ansprechen einer Apoptose-induzierenden Therapie genutzt werden.

Die Möglichkeit eines Therapiemonitorings durch CK18-Fragmentbestimmung im Serum wurde für die antivirale Therapie der Hepatitis C bereits nachgewiesen (Kronenberger *et al.*, 2007). Unter einer Therapie mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin kommt es zum Abfall der Viruslast und zu einem Verlust infizierter Zellen. Dieser korreliert mit einer gesteigerten Apoptoserate, gemessen durch den Surrogatparameter der CK18-Spaltung.

Analog dazu wäre eine Therapiekontrolle mittels CK18-Fragmentanalyse bei der RA-induzierten Apoptose in der HCC-Behandlung vorstellbar.

4.5 Die strukturelle Interaktion von CK18 und ZAP90

4.5.1 Funktionelle Bedeutung von CK18

Hepatozyten exprimieren ebenso wie Zellen des hepatozellulären Karzinoms das CK-Paar 8/18 (Fuchs und Cleveland, 1998). Dieses wurde in unseren immunhistochemischen Untersuchungen an den humanen Zelllinien Hep3B und

HepG2 verifiziert. Die Verteilung der Cytokeratine bleibt demnach auch nach maligner Transformation lange erhalten (Moll, 1994). Die Aufrechterhaltung der Expression bestimmter Cytokeratin-Paare in Tumorzellen lässt vermuten, dass diese fixe Koexpression einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Zellpopulationen darstellt.

Das Verständnis über die Funktion der Intermediärfilamente hat sich inzwischen gewandelt (Omary *et al.*, 2002). Es wird eine Beteiligung an vielfältigen zellulären Regulationsmechanismen vermutet. Cytokeratine sind dabei keine reinen Strukturproteine, sondern agieren auch als Funktionsproteine. Sie sind assoziiert mit regulierenden Proteinen und besitzen eine zellzyklusabhängige Dynamik. Neben der Co-Lokalisation mit Strukturproteinen, die der Vernetzung des Zytoskeletts dienen, werden Interaktionen mit apoptosespezifischen Kinasen beschrieben, die in Signaltransduktionskaskaden der Zelle eingreifen (Omary *et al.*, 2004).

Es wird z.B. eine Beteiligung der Cytokeratine 8/18 am p44/42-MAP-Kinase-Signalweg diskutiert. CK18 ist ein physiologisches Substrat der p44/42MAPK (Ku *et al.*, 2004). Die Verfügbarkeit dieser MAP-Kinase im Zytoplasma ist dabei abhängig vom CK18-Phosphorylierungsgrad. Möglicherweise wird über eine Interaktion mit CK18 die Aktivität von Proteinkinasen reguliert.

Proteinfunktionen werden im Wesentlichen durch ihre Proteinbindungen und posttranskriptionelle Modifikationen bestimmt. Mögliche Hinweise auf die Funktion der Cytokeratine geben dessen Proteininteraktionen. Im Sinne einer „scaffold function“ (Günther *et al.*, 1999) könnten diese Bindungen bestimmte Signaltransduktionen vermitteln. Vor diesem Hintergrund scheint die nachgewiesene Co-Lokation von CK18 und ZAP90 besonders interessant.

4.5.2 Co-Lokalisation von CK18 und ZAP90 in der all-trans Retinolsäure-induzierten Apoptose

In den vorliegenden Untersuchungen konnte bei den hepatozellulären Karzinomzelllinien ZAP90 intrazellulär detektiert werden. In der Immunfluoreszenz war eine fibrilläre Verteilung des ZAP90 in den unstimulierten Hep3B- und HepG2-Zellen zu beobachten. Eine Co-Lokalisation mit CK18 konnte in beiden Zelllinien

gezeigt werden. Die Retinolsäure-induzierte Apoptose führte zu strukturellen Veränderungen der Verteilungsmuster beider Proteine. Während der Apoptose kondensierten die faserartigen Strukturen des ZAP90. Es stellte sich ein vesikuläres Muster dar, das an das Bild der M30-Anfärbung erinnerte. Dabei war in der Doppel-Immunfluoreszenz in allen Phasen der Apoptose eine Co-Lokalisation mit CK18 nachweisbar. Dies deutet auf eine spezifische Interaktion von ZAP90 und CK18 hin.

ZAP90 zeigt als charakteristische Proteinstrukturelemente unter anderem eine Pleckstrinhomologie (PH)-Sequenz sowie eine potentielle GTPase-Domäne (Günther *et al.*, 1999). Diese Struktur motive weisen auf eine Interaktion von ZAP90 mit Regulatoren intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden hin.

In mehr als 100 Proteinen wurden PH-Domänen gefunden (Hemmings, 1997). Über eine Assoziation der PH-Domäne mit membrangebunden Phosphatidylinositolphosphaten (PIP) kann z.B. die Translokation eines entsprechenden Proteins zur Zellmembran vermittelt werden. Zudem erleichtert eine Konformationsänderung die Interaktion mit weiteren Proteinen und deren Modifizierung. Für die Phosphorylierung der humanen Proteinkinase B/AKT ist die dreidimensionale Struktur der PH-Domäne essentiell (Testa und Bellacosa, 2001). Ligandengesteuert kommt es in diesem *Survival*-Signalweg über Proteine mit GTPase-Aktivität zur Induktion von AKT und damit zur Inhibition der Apoptose.

Ein möglicher Einfluss von ZAP90 auf die Apoptoseregulation scheint denkbar. Hinweise darauf geben die bereits erwähnte Interaktion mit dem humanen Daxx, dem vor allem ein anti-apoptotischer Effekt zugesprochen wird (Chen *et al.*, 2003).

Eine regulierende Funktion in der Apoptoseinhibition wurde auch für Proteine der ZAP90 verwandten PIKE-Familie (**PI3-kinase enhancer**) beschrieben. Es werden drei verschiedene Isoformen unterschieden: PIKE- S, L und A (Ye *et al.*, 2000). Dabei wird ZAP90 von anderen Arbeitsgruppen als PIKE-A bezeichnet. Identifiziert wurde es in Glioblastom-Tumoren, ist aber auch in unterschiedlichen Gewebearten wie Milz, Thymus, Dünndarm und Leukozyten zu finden (Ahn und Ye, 2005). Es wird in verschiedenen Tumoren, wie z.B. in Sarkomen oder Neuroblastomen mit CDK4 auf dem Chromosom 12 (Genlocus 12q13.3) coamplifiziert. Erstmals beschrieben und sequenziert wurde PIKE-A bzw. ZAP90 von Nagase *et al.* (1996), hier noch als KIAA0167 bezeichnet. Es ist im Zellkern und im Zytoplasma zu finden.

PIKE-A bzw. ZAP90 bindet GTP-abhängig an aktives AKT und steigert damit die Kinaseaktivität. Durch Überexpression in verschiedenen Glioblastomzelllinien wird AKT stimuliert und konsekutiv Apoptose verhindert (Ahn und Ye, 2005). PIKE-A knockout führt dagegen zu abgeschwächter AKT-Aktivität und gesteigerter Apoptose. Neben dem Einfluss auf den *Survival*-Signalweg, scheint PIKE-A bzw. ZAP90 an der AKT-vermittelten Zellinvasion beteiligt zu sein (Chan und Ye, 2007).

Für die Genese des hepatozellulären Karzinoms lässt sich eine analoge Funktion des ZAP90 vermuten. Ein Einfluss auf den AKT-*Survival*-Signalweg erscheint anhand unserer bisherigen Ergebnisse und der Proteinstrukturelemente als wahrscheinlich. ZAP90 generiert möglicherweise durch AKT-Aktivierung einen Selektionsvorteil.

4.5.3 Der potentielle Einsatz von ZAP90 in der laborchemischen Diagnostik

Neben dem Einfluss von ZAP90 auf die Proliferations- und Apoptoseregulation könnte die ZAP90-Interaktion mit CK18 für die Diagnostik Bedeutung erlangen. Die dargestellte gewebsspezifische Verteilung der Cytokeratine und die gesteigerte Transkription von ZAP90 in proliferierenden Zellen sind Eigenschaften, die zur Entwicklung eines Tumormarkers genutzt werden könnten.

Ein Tumormarker sollte zur Bestimmung des Tumorgewebes, zur Früherfassung und zur Verlaufskontrolle geeignet sein. Es sind humoral erfassbare Produkte des Tumors selbst oder Produkte anderer Zellen als Reaktion auf das Tumorstadium (Bruhn, Fölsch, Schäfer, 2008). Alpha1-Fetoprotein (AFP) kommt beim HCC als Tumormarker zum Einsatz. Konzentrationserhöhungen kommen aber auch vor bei akuten und chronisch-aktiven Hepatitiden, Zirrhosepatienten, nicht seminomatösen Karzinomen und bei nicht hepatischen gastrointestinalen Tumoren (Magen-, Kolon-, Cholangiozelluläres-, Pankreaskarzinom). Erhöhte AFP-Werte lassen sich differenzialdiagnostisch demnach nicht sicher einem HCC zuordnen. Abhängig vom Cut-off Wert liegen die Sensitivität bei etwa 60% und die Spezifität bei 90% (Daniele *et al.*, 2004). Weil geeignete Serummarker fehlen, wird das HCC meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt.

Verschiedene Biomarker, wie Des- γ -Carboxyprothrombin (DCP) oder Insulin-like Growth Factor-1 (IGF), sind in der Erprobung, aber noch nicht klinisch validiert (El-Serag *et al.*, 2008).

Die gewebsspezifische Expression von Cytokeratinen ermöglicht den Einsatz in der Diagnostik undifferenzierter Karzinome (Herzig *et al.*, 1994, Moll, 1994). Der vermehrte Zellumsatz beim HCC führt zu einer gesteigerten Freisetzung von CK18. ZAP90 wird in proliferierenden Zellen verstärkt transkribiert (Zill, 2000). Die nachgewiesene Co-Lokalisation gibt Hinweise auf eine strukturelle Interaktion von CK18 und ZAP90.

Sollten sich entsprechende Proteinkomplexe von CK18 und ZAP90 im humanen Serum nachweisen lassen, ergäben sich daraus neue diagnostische Ansätze für das hepatozelluläre Karzinom.

5. Zusammenfassung

Die eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit fortgeschrittenem HCC machen die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien erforderlich. In der Rezidivprophylaxe des hepatozellulären Karzinoms sind Retinoide wirksame Substanzen. Die durch die Retinolsäure induzierten molekularen Mechanismen sind jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Über zytoplasmatische Signalkaskaden nimmt die Retinolsäure Einfluss auf Wachstum, Differenzierung und Induktion von Apoptose.

Die vorliegende Arbeit sollte die Transduktionskaskaden der Retinolsäurevermittelten Apoptose bei hepatozellulären Karzinomzelllinien (HepG2, Hep3B) charakterisieren und die morphologischen Veränderungen untersuchen.

In der Immunfluoreszenz und Western-Blot Analyse wurde nachgewiesen, dass die beiden Isoformen all-trans und 9-cis Retinolsäure sowohl zeit- (30 Minuten - 18 Stunden), als auch konzentrationsabhängig (5 μ M - 200 μ M) in den humanen Zelllinien HepG2 und Hep3B Apoptose induzieren.

Die molekularbiologischen Vorgänge in den Zellen wurden durch Western-Blot Analysen näher charakterisiert. Durch die Inkubation mit fetalem-Kälber-Serum (FCS) kommt es zur Aktivierung von antiapoptotischen Signalwegen wie der p44/42MAPK- oder AKT-Kaskade. Die Kinasen werden durch all-trans Retinolsäure (atRA) in HepG2- und Hep3B-Zellen unterschiedlich beeinflusst.

P44/42 ist eine Onkogenese-assoziierte Kinase und besitzt eine anti-apoptotische Funktion. Stimulation mit TPA (Tetradecanoylphorbolacetat) führte zu einer Aktivierung des p44/42-MAP-Kinase-Signalwegs, was in einer Inhibition der atRA-vermittelten Apoptose resultierte. Retinolsäure induziert Apoptose bei hepatozellulären Karzinomzelllinien unter anderem über die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38. Eine Hemmung des p44/42-MAP-Kinase-Signalwegs durch Retinolsäure konnte in den vorliegenden Untersuchungen bei den HepG2-Zellen nicht nachgewiesen werden.

Der Proteinkinase B/AKT- Signalweg wurde durch all-trans Retinolsäure inhibiert. Die Aktivität des phosphorylierten AKT nahm sowohl bei dem PI3K-Inhibitor LY294002,

als auch bei der Retinolsäure-Stimulation ab. Durch Hemmung des *Survival*-Signalwegs stieg die Apoptoserate an. Dieses wurde mittels siRNA-Versuche bestätigt. Posttranskriptionelle Inhibition der AKT-Translation führte zur gesteigerten Apoptose, die durch Retinolsäure noch maximiert werden konnte.

Im Gegensatz zu den Retinoiden induzierte die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Fas-Rezeptor nur bei einer Zelllinie (HepG2) Apoptose. Hep3B-Zellen bilden kaum Fas-Rezeptoren aus. Die Retinolsäure besitzt hingegen als lipophile Substanz eine hohe Zellpermeabilität und kann unabhängig von der Rezeptorexpression auf der Membranoberfläche Apoptose induzieren.

Eine direkte Aktivierung von proapoptotischen Kinasen und Inhibition von *Survival*-Signalwegen durch all-trans Retinolsäure ist wahrscheinlich. Unabhängig von der Retinolsäure-vermittelten Genregulation werden demnach apoptotische Signaltransduktionskaskaden induziert.

Der Apoptosenachweis erfolgte in den Versuchen durch die cIARP-Bestimmung (cleaved Poly-ADP-Ribose-Polymerase) im Western-Blot. Analog dazu konnten Fragmente von Cytokeratin 18 (CK18) nachgewiesen werden. Beide hepatozellulären Karzinomzelllinien exprimierten das Cytokeratin-Paar 8/18. Durch Caspase-Aktivität kam es während der Apoptose zur Spaltung von CK18.

Nach Retinolsäure-Stimulation zeigten sich in der immunhistochemischen Untersuchung eine apoptosespezifische Morphologie des Intermediärfilaments und die Fluoreszenz des M30-Antikörpers (M30 CytoDeath®). Als Epitop dieses Antikörpers dienen die durch die Caspase-Spaltung freigesetzten CK18-Fragmente. Apoptosemessung durch die CK18-Fragmentbestimmung eignete sich in unseren Versuchen als Alternative zum etablierten Nachweis von cIARP. Dadurch ließe sich im Serum von HCC-Patienten die Caspase-Aktivität in Hepatozyten und damit die Apoptose mit einem kommerziellen ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) detektieren. Die Quantifizierung von gespaltenem CK18 im Serum könnte für das Therapiemonitoring einer Apoptose-induzierenden Behandlung genutzt werden.

Die Bedeutung der Cytokeratine geht über den Erhalt der mechanischen Stabilität hinaus. Sie haben nicht nur die Aufgaben eines Strukturproteins, sondern sind Funktionsträger in intrazellulären Signalkaskaden. Assoziationen mit verschiedenen

Krankheiten lassen eine Beteiligung an der Regulation von Proliferation, Zelldifferenzierung oder Apoptose wahrscheinlich erscheinen.

Die dargestellte Co-Lokalisation des ZAP90-Proteins und dem Cytokeratin 18 ist vor diesem Hintergrund besonders interessant. Bei beiden hepatozellulären Karzinomzelllinien war ZAP90 nachweisbar. In den immunhistochemischen Untersuchungen waren ZAP90 und CK18 intrazellulär co-lokalisiert. Die Retinolsäure-induzierte Apoptose führte zu strukturellen Veränderungen der Verteilungsmuster beider Proteine. Auch nach der CK18-Spaltung war eine Co-Lokalisation der entstandenen CK18-Fragmente mit ZAP90 erkennbar. In der Doppel-Immunfluoreszenz war in allen Phasen der Apoptose eine Co-Lokalisation zu konstatieren.

Dieses deutet auf eine spezifische Interaktion von ZAP90 und CK18 hin. Eine mögliche Assoziation lässt für beide Proteine eine Rolle in der Karzinogenese vermuten. Im Sinne einer „scaffold function“ könnten Protein-Interaktionen bestimmte Signaltransduktionen vermitteln. Es wäre denkbar, dass ZAP90 durch Multiproteinkomplexbildung eine regulierende Funktion ausübt. So lassen die Proteinstruktur motive des ZAP90 (PH-Domäne, GTPase-Motiv) z.B. eine funktionelle Interaktion mit dem AKT-Signalweg vermuten. Die vorliegenden Ergebnisse sowie die Überexpression von ZAP90 in Pankreaskarzinomzellen und hepatozellulären Karzinomzelllinien weisen auf eine mögliche regulative Aufgabe in anti-apoptotischen Signalkaskaden hin.

Das Vorkommen von CK18-gebundenem ZAP90 könnte zudem vom besonderen klinischen Interesse sein. Zur Diagnose des HCC in frühen Stadien fehlen weiterhin geeignete Tumormarker. Sollten sich entsprechende Proteinkomplexe von CK18 und ZAP90 im humanen Serum nachweisen lassen, ergäben sich daraus weiterführende diagnostische Ansätze.

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

AFP	Alpha1-Fetoprotein
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ATCC	American Type Culture Collection
atRA	all-trans Retinolsäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDK	cyclin dependent kinase
CHO	chinese hamster ovarial cells
9-cisRA	9-cis Retinolsäure
CK	Cytokeratin
cIPARP	cleaved Poly-ADP-Ribose-Polymerase
dH ₂ O	destilliertes Wasser
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal regulated kinase = p44/42 MAPK
Fas/CD95/APO-1	Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie
FCS	fetales-Kälber-Serum
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde/n
HCC	hepatozelluläres Karzinom
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
MAP	mitogen activated protein
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAR	matrix associated region

min	Minute/n
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PH	Pleckstrin-Homologie
ph	phosphoryliert
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIKE	phosphatidylinositol 3-kinase enhancer
PIP3	PI-3,4,5-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
pRb	Retinoblastoma Protein
RA	Retinolsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
siRNA	small interfering RNA
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

6.2 Literaturverzeichnis

Adachi S, Moriwaki H, Muto Y, Yamada Y, Fukutomi Y, Shimazaki M, Okuno M, Ninomiya M (1991): Reduced retinoid content in hcc with reference to alcohol consumption. *Hepatology*. 14:776-780

Ahn JY, Ye K (2005): Pike GTPase signaling and function. *Int J Biol Sci*. 1:44-50

Anderson JM, Heindl LM, Bauman PA, Ludi CW, Dalton WS, Cress AE (1996): Cytokeratin expression results in a drug-resistant phenotype to six different chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*. 2:97-105

Arce F, Gatjens-Boniche O, Vargas E, Valverde B, Diaz C (2005): Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids atra and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2. *Cancer Lett*. 229:271-281

Ashkenazi A, Dixit VM (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281:1305-1308

Bosch X, Ribes J, Diaz M, Cleries R (2004): Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 127:5-16

Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C (2008): Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology*. 48:137-45

Brembeck FH, Schoppmeyer K, Leupold U, Gornistu C, Keim V, Mossner J, Riecken EO, Rosewicz S (1998): A phase II pilot trial of 13-cis retinoic acid and interferon-alpha in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Cancer*. 83: 2317-23

Bruhn HD, Fölsch UR, Schäfer H (2008): Labormedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte. Pathophysiologie und Klinik. *Schattauer-Verlag, Stuttgart*

Carr BI (2004): Hepatocellular carcinoma: current management and future

trends. *Gastroenterology*.127:218-224

Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG (1997): Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol*. 138:1379-1394

Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG (2000): Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 149:17-22

Cavestro GM, Frulloni L, Nouvenne A, Neri TM, Calore B, Ferri B, Bovo P, Okolicsanyi L, Di Mario F, Cavallini G (2003): Association of keratin 8 gene mutation with chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis*. 35:416-420

Chan CB, Ye K (2007): PI3K are phosphoinositide-3-kinase enhancers, suppressing programmed cell death. *J Cell Mol Med*. 11:39-53

Chang H, Yang X (2000): Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:821-846

Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D (1998): Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein daxx. *Science*. 281:1860-1863

Chang L, Karin M (2001): Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410:37-40

Chen LY, Chen JD (2003): Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol*. 23:7108-7121

Coulombe PA, Omary MB (2002): 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 14:110-122

Daniele B, Bencivenga A, Megna AS, Tinessa V (2004): Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 127:108–112.

Davis RJ (2000): Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103:239-252

Debatin KM, Krammer PH (2004): Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. 23:2950-2966

Di Bisceglie AM (2004): Issues in screening and surveillance for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 127:104-107

Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR, Greenberg ME, Sawyers CL, Davis RJ (1997): A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science*. 277:693-696

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:457-467

El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR (2008): Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 134:1752-1763

El-Serag HB, Rudolph KL (2007): Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 132:2557–2576

Falasca L, Favale A, Gualandi G, Maietta G, Conti Devirgiliis L (1998): Retinoic acid treatment induces apoptosis or expression of a more differentiated phenotype on different fractions of cultured fetal rat hepatocytes. *Hepatology*. 28:727-737

Falasca L, Marcellini P, Ara C, Rufo A, Devirgiliis LC (1999): Growth inhibition and induction of specific hepatic phenotype expression by retinoic acid in HepG2 cells. *Anticancer Res*. 19:3283-3292

Fan M, Chambers TC (2001): Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist Updat*. 4:253-267

Farazi PA, DePinho RA (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 6:674-687

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F (2004): Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 127:35-50

Fenaux P, Chomienne C, Degos L (2001): All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol*. 38:13-25

Fuchs E, Cleveland DW (1998): A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*. 279:514-519

Fürst, M (2008): Charakterisierung zur Signaltransduktion der Retinolsäure-induzierten Apoptose in humanen Hepatomzellen HepG2, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Gao Y, Shan YQ, Pan MX, Wang Y, Tang LJ, Li H, Zhang Z (2004): Protein kinase C-dependent activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase and heat shock protein 70 in signal transduction during hepatocyte ischemic preconditioning. *World J Gastroenterol*. 10:1019-1027

Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N (2001): Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol*. 154:763-773

Gorina S, Pavletich NP (1996): Structure of p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*. 274:1001-1005

Green DR (2000): Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*. 102:1-4

Günther R, Zill H, Schmidt WE, Fölsch UR (1999): ZAP-Gene: Charakterisierung der Proteinstruktur einer neuen Familie proliferationsassoziiierter Gene im exokrinen Pankreas, *Med Klin*. 94:233-238

Hemmings BA (1997): PH-Domains – a universal membrane adapter. *Science*. 275:1899-1900

Herzig KH, Altmannsberger M, Fölsch UR (1994): Intermediate filaments in rat pancreatic acinar tumors, human ductal carcinomas, and other gastrointestinal malignancies. *Gastroenterology*. 106:1326-32

Hoofnagle, JH (2004): Hepatocellular carcinoma: summary and recommendations. *Gastroenterology*. 127:319-323

Houghton JA, Harwood FG, Tillman DM (1997): Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via fas signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:8144-8149

Huynh HT, Nguyen TTT, Chow PKH, Tan PH, Soo KC (2003): Over-expression of mitogen-activated protein kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol*. 3:19-39

Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, Kiyono T, Takahashi T, Momoi T, Inagaki M (2001): Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol*. 155:415-426

Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Miyoshi E, Noda K, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Taniguchi N, Monden M (1999): Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology*. 30:90-99

Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M (1998): Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 27:951-958

Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N (2003): Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 97:3017-3026

Kaneki M, Kharbanda S, Pandey P, Yoshida K, Takekawa M, Liou JR, Stone R, Kufe D (1999): Functional role for protein kinase C beta as a regulator of stress-activated protein kinase activation and monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biol.* 19:461-470

Kojima S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Friedmann SC, Moriwaki H (2004): Acyclic retinoid in the chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 24: 797-805

Kronenberger B, Zeuzem S, Sarrazin C, Mihm U, von Wagner M, Hofmann WP, Piiper A, Herrmann E (2007): Dynamics of apoptotic activity during antiviral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther.*12:779-87

Ku NO, Darling JM, Krams SM, Esquivel CO, Keeffe EB, Sibley RK, Lee YM, Wright TL, Omary MB (2003a): Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:6063-6068

Ku NO, Fu H, Omary MB (2004): Raf-1 activation disrupts its binding to keratins during cell stress. *J Cell Biol.* 166:479-485

Ku NO, Liao J, Omary MB (1997): Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem.* 272:33197-33203

Ku NO, Lim JK, Krams SM, Esquivel CO, Keeffe EB, Wright TL, Parry DA, Omary MB (2005): Keratins as susceptibility genes for end-stage liver disease. *Gastroenterology.* 129:885-893

Ku NO, Omary MB (2000): Keratin turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *J Cell Biol.* 149:547-552

Ku NO, Soetikno RM, Omary MB (2003b): Keratin mutation in transgenic mice predisposes to fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology.* 37:1006-1014

Lalioi VS, Vergarajauregui S, Tsuchiya Y, Hernandez-Tiedra S, Sandoval IV (2009): Daxx functions as a scaffold of a protein assembly constituted by GLUT4, JNK1 and KIF5B. *J Cell Physiol.* 218:416-26

Lee JS, Thorgeirsson SS (2006): Comparative and integrative functional genomics of hcc. *Oncogene.* 25:3801-3809

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Raoul J, Zeuzem S, Poulin-Costello M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2007): Sorafenib improves survival in advanced hepatocellular carcinoma: results of a phase III randomized placebo-controlled trial (SHARP trial). *J Clin Oncol.* (Suppl) 25:18S

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group (2008): Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 359:378-90

Lovat PE, Ranalli M, Bernassola F, Tilby M, Malcolm AJ, Pearson AD, Piacentini M, Melino G, Redfern CP (2000): Synergistic induction of apoptosis of neuroblastoma by fenretinide or CD437 in combination with chemotherapeutic drugs. *Int J Cancer.* 88:977-985

MacKay JP, Crossley M, (1998): Zinc finger are sticking together. *Trends Biochem Sci.* 23:1-4

Malhi H, Gores GJ (2008): Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology.* 134:1641-54

Mangelsdorf DJ (1994): Vitamin A receptors. *Nutr Rev.* 52:32-44

Maßmann K (2000): Das „2-Hybrid-System“ in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Identifikation von ZAP-Protein Bindungspartnern, Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H (2003): Molecular mechanism for growth suppression of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid. *Carcinogenesis*. 24:1353-1359

Mayo L, Donner D (2001): A phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway promotes translocation of mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:11598-11603

Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P (1999): Loss of daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev*. 13:1918-23

Mitsui H, Takuwa N, Maruyama T, Maekawa H, Hirayama M, Sawatari T, Hashimoto N, Takuwa Y, Kimura S (2001): The MEK1-ERK map kinase pathway and the PI3-kinase-akt pathway independently mediate anti-apoptotic signals in HepG2 liver cancer cells. *Int J Cancer*. 92:55-62

Moll R (1994): Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors. *Int J Biol Markers*. 9:63-69

Müller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR (1997): 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

Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT, Tanaka T, Tsurumi K, Okuno M, Tomita E, Nakamura T, Kojima T (1996): Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patient with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 334:1561-1567

Muto Y, Moriwaki H, Saito A (1999): Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patient with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 340:1046-1047

Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tanaka A, Nomura N (1996): Prediction of the

coding sequences of unidentified human genes. V. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0161-KIAA0200) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 (supplement). *DNA Res.* 3:17-24

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000): Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 403:98-103

Nakamura N, Shidoji Y, Yamada Y, Hatakeyama H, Moriwaki H, Muto Y (1995): Induction of apoptosis by acyclic retinoid in the human hepatoma-derived cell line HuH7. *Biochem Biophys Res Commun.* 207:382-388

Natoli G, Ianni A, Costanzo A, De Petrillo G, Ilari I, Chirillo P, Balsano C, Levrero M (1995): Resistance to fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene.* 11:1157-1164

Ng SSW, Tsao MS, Chow S, Hedley DW (2000): Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 60:5451-5455

Nicholson KM, Anderson NG (2002): The protein kinase B/akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 14:381-395

Ocker M, Herold C, Ganslmayer M, Zopf S, Hahn EG, Schuppan D (2004): Potentiated anticancer effects on hepatoma cells by the retinoid adapalene. *Cancer Lett.* 208:51-58

Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi H, Muto Y, Friedmann SC, Moriwaki H (2004): Retinoids in cancer chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets.* 4:285-298

Omary MB, Coulombe PA, McLean WH (2004): Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med.* 351:2087-2100

Omary MB, Ku NO, Toivola DM (2002): Keratins: guardians of the liver.

Hepatology. 35:251-257

Pang R, Poon RT (2007): From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology*. 72:30-44

Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA (2001): TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol*. 3:708-714

Roy S, Nicholson DW (2000): Cross-talk in cell death signalling. *J Exp Med*. 192:21-25

Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV (1997): Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 236:54-58

Sheard MA, Vojtesek B, Simickova M, Valik D (2002): Release of cytokeratin-18 and -19 fragments (TPS and CYFRA 21-1) into the extracellular space during apoptosis. *J Cell Biochem*. 85:670-677

Sun SY, Lotan R (2002): Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol*. 41: 41-55

Sundaresan A, Claypool K, Mehta K, Lopez-Berestein G, Cabanillas F, Ford RJ Jr. (1997): Retinoid-mediated inhibition of cell growth with stimulation of apoptosis in aggressive B-cell lymphomas. *Cell Growth Differ*. 8:1071-82

Takai K, Okuno M, Yasuda I, Matushima-Nishiwaki R, Uematsu T, Tsurumi H, Shiratori Y, Muto Y, Moriwaki H (2005): Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. Updated analysis of long-term follow-up data. *Intervirology*. 48:39-45

Talwalkar JA, Gores GJ (2004): Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 127: 126-132

Testa JR, Bellacosa A (2001): Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl*

Acad Sci USA. 98:10983-10985

Toivola DM, Ku NO, Resurreccion EZ, Nelson DR, Wright TL, Omary MB (2004): Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology*. 40:459-466

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2000): Requirement of JNK for stress-induced activation of cytochrom c mediated death pathway. *Science*. 288:870-874

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994): A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. 269:5241-5248

Vollbrecht H (2002): Zellzyklus-abhängige Regulation des Pankreaskarzinom-assoziierten Proteins ZAP90, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Walczak H, Krammer PH (2000): The CD95 (APO-1/fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis system. *Exp Cell Res*. 256:58-66

Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE (2006): In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 44:27-33

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270:1326-1331

Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D (1997): Daxx, a novel fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 89:1067-1076

Yasuda I, Shiratori Y, Adachi S, Obora A, Takemura M, Okuno M, Shidoji Y, Seishima M, Muto Y, Moriwaki H (2002): Acyclic retinoid induces partial differentiation, down-regulates reverse transcriptase mRNA expression and telomerase activity, and induces apoptosis in human hepatoma-derive cell lines. *J Hepatol*. 36:660-671

Ye K, Hurt KJ, Wu FY, Fang M, Luo HR, Hong JJ, Blackshaw S, Ferris CD, Snyder SH (2000): Pike. A nuclear GTPase that enhances PI3-kinase activity and is regulated by protein 4.1N. *Cell*. 103:919-930

Yuan JM, Gao YT, Ong CN, Ross RK, Yu MC (2006): Prediagnostic level of serum retinol in relation to reduced risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 98:482-490

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001): Cytoplasmic localization of p21cip1/waf1 by akt induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 3:245-252

Zill H (2000) Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des ZAP90-Proteins und dessen Interaktion mit dem Tumorsuppressor pRb am Beispiel der molekularen Pankreaskarzinogenese, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

7. Danksagung

Ich danke meinem Betreuer, Dr. med. Rainer Günther, der für die Leitung und Durchführung dieses Projekts verantwortlich war.

Herrn Professor em. Dr. med. Ulrich R. Fölsch, ehemaliger Direktor der Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die kritischen Anmerkungen der vorliegenden Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Stefan Schreiber, Direktor der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für das Einverständnis, die vorliegende Arbeit in seinem Institut fertigzustellen.

Besonders danken möchte ich Iris Bauer für ihre große Hilfe bei der praktischen Arbeit im Labor. Großer Dank gebührt zudem meinem Doktorandenvorgänger Dr. med. Matthias Fürst, der mir durch zahlreiche Tipps den Einstieg in die behandelte Thematik erleichterte.

Für die Hilfe beim Bearbeiten der Abbildungen und das Lösen sonstiger Formatierungsprobleme möchte ich mich herzlich bei Thorsten Graf bedanken.

Außerdem danke ich meiner Mutter Karin Hagemann und Schwester Claudia Hagemann, ohne deren Unterstützung diese Arbeit und das Studium nicht möglich gewesen wären.

Mein verstorbener Vater Dr. med. Peter Hagemann ist ein bleibendes Vorbild, ihm verdanke ich unendlich viel.

Für den moralischen Beistand, die wertvollen Ratschläge bei der Niederschrift und die Hilfe beim Korrekturlesen danke ich meiner Verlobten Julia Maith.

8. Lebenslauf

Götz Peter Hagemann

Persönliche Daten

Geburtsdatum und -ort: 02. Mai 1979 in Bad Karlshafen
 Anschrift: Feldstr. 102, 24105 Kiel
 Telefon: 0431-3854070
 eMail: goetz.hagemann@gmx.de
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig, keine Kinder

1985-1998

Schulbildung

Grundschule, Gesamtschule und Oberstufe in Hofgeismar, Erwerb der Hochschulreife

1998-1999

Zivildienst

Verein für geistig- und körperbehinderte Menschen, Hofgeismar

1999-2000

Berufsausbildung

Studium der Psychologie an der Philipps-Universität zu Marburg

2000-2003

Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität zu Marburg, Erwerb der Ärztlichen Vorprüfung und des Ersten Teils der Ärztlichen Prüfung

2003-2005	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Erwerb des Zweiten Teils der Ärztlichen Prüfung
2005-2006	Praktisches Jahr an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Erwerb des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung
2007	Erwerb der Approbation
seit 2007	Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für „Innere Medizin“ in der II. Medizinischen Klinik, UK-SH, Campus Kiel, Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba
seit 2004	<p data-bbox="596 904 762 945">Promotion</p> <p data-bbox="596 958 1393 1111">Beginn der vorliegenden Dissertation an der Klinik für Allgemeine Innere Medizin, UK-SH, Campus Kiel, Prof. Dr. med. U.R. Fölsch</p> <p data-bbox="596 1178 818 1218">Posterbeiträge:</p> <p data-bbox="596 1232 1393 1603">Hagemann G, Fölsch UR, Günther R : Strukturelle Interaktionen von ZAP90 und Cytokeratin 18 am Beispiel der Retinolsäure-induzierten Apoptose in humanen Hepatomzelllinien. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Berlin, 01.-04. Oktober 2008. P127</p> <p data-bbox="596 1671 1393 1984">Hagemann G, Fürst M, Braun F, Günther R : Strukturelle Interaktion von Cytokeratin 18 und ZAP90 im Rahmen der Retinolsäure-induzierten Apoptose in humanen Hepatomzelllinien. 25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Heidelberg, 30.-31. Januar 2009. P2.12</p>

Fort- und Weiterbildung

2008

Schulung für Prüfarzte „GCP-Training (Good Clinical Practice)“ in der II. Medizinischen Klinik der Johann-Wolfgang-Goethe Universität zu Frankfurt a.M.

seit 2008

Teilnahme als Prüfarzt an der Phase III-Studie „HD-18“ (Therapieoptimierungsstudie in der Primärtherapie des fortgeschrittenen Hodgkin Lymphoms: Therapiestratifizierung mittels FDG-PET).

Leiter: Prof. Dr. med. A. Engert, I. Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Köln