

Aus der Sektion für Molekulare Onkologie

(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)

Institut für Experimentelle Tumorforschung / Krebszentrum Nord - CCC

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

# **Qualitative und semi-quantitative Analyse der Proteinexpression bei Pankreaskarzinomzellen nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Matthias Kühl**

aus Horst (Holstein)

**Kiel 2010**

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Kalthoff, Institut für Experimentelle Tumorforschung

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Kabelitz, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2010

Zum Druck genehmigt: 03.11.2010

Gezeichnet: Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi, Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

*Meiner Familie*

---

## **Inhaltsverzeichnis**

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Klinische Aspekte von Pankreasadenokarzinomen .....	1
1.2	Apoptose als Regulationsmechanismus der Gewebshomöostase .....	2
1.3	Apoptotische und nicht-apoptotische Signalwege auf molekularer Ebene.....	3
1.3.1	Rezeptorvermittelte Apoptose .....	3
1.3.2	Mitochondriale Amplifizierung und intrinsische Apoptoseinduktion.....	6
1.3.3	Caspasen als Schlüsselenzyme der Apoptose.....	9
1.4	Der NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	10
1.5	Zielsetzung.....	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
2.1	Zellkultur .....	15
2.1.1	Auftauen kryokonservierter Zellen.....	15
2.1.2	Kultivierung der Zellen.....	15
2.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	16
2.1.4	Stimulation des CD95-Todesrezeptors .....	16
2.2	Proteinanalysen.....	17
2.2.1	Lyse von Zellen .....	17
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (PIERCE-Assay).....	19
2.2.3	Gelelektrophorese .....	19
2.2.4	Westernblot .....	21
2.2.5	Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme mit NIH Image 1.62f .....	25
2.2.6	Caspase-Assays .....	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>29</b>
3.1	Parameteranalyse für semiquantitative Westernblots .....	29

3.1.1	Vorgaben für die Mindestqualität von Westernblots.....	29
3.1.2	Verdünnungsreihen und Bandenintensität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration .....	34
<b>3.2</b>	<b>Quantitative Konzentrationsverläufe apoptose-relevanter Proteine nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors.....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Pro-Caspasen und Bid .....	40
3.2.2	FADD und Bax.....	45
3.2.3	Die Apoptose-Inhibitor-Proteine (cIAP1, cIAP2, XIAP) .....	49
3.2.4	TRAF2 und RIP .....	53
<b>3.3</b>	<b>Veränderung von Zellproliferation und Zelltod nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4</b>	<b>Bestimmung der Caspase-Aktivität .....</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>- 62 -</b>
4.1.1	Unterschiedliche Dynamik der Caspase-Kaskade in den untersuchten Zelllinien .....	- 62 -
4.1.2	Dynamische Proteinkonzentrationsänderungen im Rahmen nichtapoptotischer Signalkaskade .....	- 66 -
<b>4.2</b>	<b>Beurteilung semiquantitativer Daten bei Röntgenfilm-basiertem Westernblotting .....</b>	<b>- 71 -</b>
4.2.1	Beziehung zwischen Proteinmenge und Bandenintensität in dynamischen Systemen .....	- 71 -
4.2.2	Problematik der Beladungskontrolle und Eichung anhand von „Housekeeping“-Proteinen.....	- 73 -
4.2.3	Synopsis: (Semi-)Quantitative Analysen aus chemilumineszenz-basierten Untersuchungsverfahren .....	- 74 -
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>- 76 -</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURNACHWEIS.....</b>	<b>- 78 -</b>
<b>7</b>	<b>TABELLARISCHER ANHANG .....</b>	<b>IX</b>

---

## Abkürzungs- und Akronymverzeichnis

---

AMC	Aminomethylcoumarin
APAF	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bak	Bcl-2-associated X Protein, ein Bcl-Protein
Bax	Bcl-2 Antagonist or Killer, ein Bcl-Protein
BCA	Bichinonsäure (bichinonic acid)
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“, Apoptoseprotein, erstmals isoliert in B-Zell-Lymphomen; Namensgeber für eine Gruppe von Apoptoseproteinen
BH	Bcl-2-Homologie-Region
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist, (ein Bcl-Protein)
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine)
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEVD	Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure (1-Buchstaben-Aminosäure-Code)
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)

FLIP	FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IAP	Inhibitor of apoptosis protein (cIAP-1, cIAP-2, XIAP)
IETD	Isoleucin-Glutaminsäure-Threonin-Asparaginsäure (1-Buchstaben-Aminosäure-Code)
I $\kappa$ B	Inhibitorisches $\kappa$ B-Protein (Inhibitor of NF- $\kappa$ B)
kDa	Kilo-Dalton (Molekulargewicht)
LEHD	Leucin-Glutaminsäure-Histidin-Asparaginsäure (1-Buchstaben-Aminosäure-Code)
NF- $\kappa$ B	Zellkernfaktor kappa B (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)
NIH	National Institutes of Health (nationales Gesundheitsinstitut der Vereinigten Staaten)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
ppi	pixel per inch (Bildauflösung)
PTFE	Polytetrafluorethylen
tBid	gespaltenes Bid (truncated Bid)
RIP	Rezeptor-interaktives Protein
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute

## Abkürzungs- und Akronymverzeichnis

---

SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SMAC	Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF-Receptor-Associated Death Domain
TRAF	TNF-Receptor-Associated Factor

---

### **Anmerkungen:**

Gesetzlich geschützte Markenzeichen werden ohne besondere Kennzeichnung verwendet.



# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Aspekte von Pankreasadenokarzinomen

Pankreaskarzinome sind nach Darm- und Magenkarzinomen die dritthäufigste Krebserkrankung des Verdauungstraktes [1]. Die jährliche Zahl der Neuerkrankungen an Pankreaskarzinomen in Deutschland wird mit 11800 bis 13500 beziffert [2], dies entspricht ca. 3% aller Krebserkrankungen [1]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 (Männer) bzw. 70 (Frauen) Jahren. Mit 90% stellen die vom Gangepithel ausgehenden duktaalen Adenokarzinome den größten Anteil der vom Pankreas ausgehenden Karzinome dar.

Die Prognose des duktaalen Pankreaskarzinoms ist schlecht. In mehr als 95% der Fälle ist diese Erkrankung nicht heilbar [3]. Die Prognose wird dabei vor allem durch die sehr frühe lymphogene, neurogene und hämatogene Metastasierung bestimmt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind über 90% der Karzinome über die Grenzen des Pankreas ausgebreitet, in 30% der Fälle liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Metastasierung vor.

Die einzige kurative Therapie ist die radikale operative Tumorentfernung, eine Heilung ist allerdings nur im Stadium I und II zu erreichen (Übersichtsarbeit [4]). Gelingt bei Pankreaskopf-Karzinomen eine R0-Resektion (10 - 25% der Patienten) so beträgt das mediane Überleben zwischen 17 und 28 Monaten, das tatsächliche 5-Jahres-Überleben unter 5%. In ca. einem Drittel der mit kurativem Ansatz durchgeführten Resektionen lässt sich im Schnittrand eine Tumorerinfiltration nachweisen (R1-Resektion). Bei R1-Resektion oder (palliativer) R2-Resektion liegt das mediane Überleben zwischen 8 und 22 Monaten.

Durch die Anwendung einer adjuvanten Chemotherapie bzw. multimodaler adjuvanter Therapie wird das Überleben der Patienten zwar verbessert, die erreichte Überlebenszeitverlängerung beträgt aber nur wenige Monate [4]. Dies weist auf die

## 1. Einleitung

---

weitgehende Resistenz gegenüber adjuvanten chemo- und radiotherapeutischen Behandlungsstrategien hin.

Es wird angenommen, dass die bei Pankreaskarzinomen häufig beobachtete Apoptose-Resistenz für diese hohe Resistenz gegenüber zytotoxischen Einflüssen verantwortlich ist.

### **1.2 Apoptose als Regulationsmechanismus der Gewebshomöostase**

Apoptose ist das genetisch determinierte Todesprogramm von Zellen und ist als solches in viele Mechanismen der Gewebshomöostase multizellulärer Organismen eingegliedert [5]. Die Gewebshomöostase, also das Gleichgewicht von Zellteilung (Mitose), Differenzierung und Tod von Zellen, muss genau reguliert werden. Zu viel Wachstum und zu wenig Absterben von Zellen können vor allem zu Krebserkrankungen führen und letztlich den Tod des Gesamtorganismus nach sich ziehen.

Defekte in den Signalketten der Apoptose können zu einem vermehrten Wachstum einzelner Zellklone in einem Gewebe führen und damit dem Entstehen von Neoplasmen Vorschub leisten. Des Weiteren können karzinomatöse Zellklone mit defektem Ablauf der Apoptose einer zytotoxischen Eliminierung durch Zellen des Immunsystems entgehen. Auch gesteigerter Zelltod kann zu Fehlfunktionen von Organsystemen und schwerwiegenden Erkrankungen führen.

In der onkologischen Therapie nehmen die Vorgänge der Apoptose ebenfalls eine Schlüsselposition ein, denn der programmierte Zelltod ist neben der Nekrose maßgeblich für den Effekt von Chemotherapie und Radiatio in der Krebsbekämpfung verantwortlich (z.B. [6]). Somit werden nicht nur die Entstehung von Krebs und seine Progression im Organismus, sondern auch seine Resistenz gegenüber medizinischen Behandlungsmethoden durch Defekte von Proteinen des Apoptose-Signalweges gefördert. Daher ermöglicht ein näheres Verständnis der Mechanismen die zum Zelltod führen, sowie der vielgestaltigen Arten, mit denen Krebszellen der Apoptose auf molekularer Ebene entgehen, nicht nur tiefere Einblicke in die Krebsentstehung sondern vermag auch die Behandlungsstrategien zu beeinflussen.

Dies ermöglicht sogar Ansätze für vollkommen neue Behandlungsmethoden durch direktes Eingreifen in die molekularen Prozesse im Rahmen der Apoptose [5],[6].

### **1.3 Apoptotische und nicht-apoptotische Signalwege auf molekularer Ebene**

Es gibt zwei unterschiedliche Wege die Apoptose zu initiieren. Der „extrinsische“ Mechanismus wird über die Ligandenbindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt. Der „intrinsische“ Weg beinhaltet als wichtige Station auf dem Signalweg die Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom C aus selbigen und wird durch Signale im Innern der Zelle selber aktiviert (z.B. nach Schädigung der DNA, s. u.). Daneben ist aber auch die Einbindung der Mitochondrien in die rezeptorvermittelte Apoptose möglich [5]. Beiden Wegen gemeinsam ist die Schlüsselfunktion von aspartyl-spezifischen Cystein-Proteasen, den sogenannten Caspasen. Alle Caspasen werden als Proenzyme gebildet (Pro-Caspasen) und über proteolytische Spaltung aktiviert [7]. Dabei spalten und aktivieren sie sich in einer Kaskade auch gegenseitig. Ihre Aktivierung führt zu charakteristischen biochemischen und molekularen Veränderungen, die einen Zellzyklus-Arrest und letzten Endes den Tod der Zelle zur Folge haben.

Neben diesen - extrinsischen und intrinsischen - apoptotischen Signalkaskaden gibt es Kaskaden, die parallel dazu, z.B. im Rahmen rezeptorvermittelter Apoptose, aktiviert werden und nicht zur Apoptose führen. Diese nicht-apoptotischen Signalwege führen z.B. zu Entzündungsprozessen oder zu Veränderungen auf Gen- und Proteinebene, die der Apoptose entgegengesetzt sind.

Im Folgenden werden zunächst beide apoptotischen Signalwege, der Verbindungsweg zwischen ihnen sowie regulierende Einflüsse kurz charakterisiert. Des Weiteren folgt darauf eine kurze Übersicht über den NF- $\kappa$ B-Signalweg als Beispiel für nicht-apoptotische Prozesse im Rahmen der Todesrezeptor-Aktivierung.

#### **1.3.1 Rezeptorvermittelte Apoptose**

Für den extrinsischen Signalweg der Apoptose ist die Bindung verschiedener Moleküle, sog. „Todes-Liganden“ an auf der Oberfläche der Zellen gelegene

## 1. Einleitung

---

Todesrezeptoren nötig. Die Induktion von Zelltod durch Zugabe von Tumor-Nekrosefaktor (TNF) wurde erstmals 1975 von Carswell et al. beschrieben [8]. Die für die Apoptose verantwortlichen Todesrezeptoren gehören zur TNF-Rezeptorfamilie, über die auch verschiedene Wachstums- und Differenzierungsvorgänge reguliert werden. Todesrezeptoren besitzen eine intrazelluläre Domäne, die als Todes-Domäne bezeichnet wird und pro-apoptotisch wirkt. Für diese Arbeit wichtig und zudem sehr gut charakterisiert ist der CD95-Rezeptor [9]. Die Bindung von CD95-Ligand oder auch agonistischen Antikörpern (im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der anti-CD95-Antikörper CH11 verwendet) an diesen Rezeptor bewirkt eine Rezeptor-Trimerisation, die in einer Bindung des Fas-associated death domain protein (FADD, auch genannt MORT1) an die Todesdomänen resultiert. Diese Kombination aus Todesdomänen und FADD startet die eigentliche intrazelluläre Kaskade, die zur Apoptose führt. Dies geschieht durch Bindung und anschließende Spaltung und damit Aktivierung von Pro-Caspasen (Pro-Caspase-8 und Pro-Caspase-10) in ihre Spaltprodukte, die Caspasen-8 und -10 [10-12]. Diese Caspasen setzen nun die Kaskade in Gang, die zum Tod der Zelle führt; sie werden daher als „Initiator-Caspasen“ bezeichnet. Die Kombination aus Rezeptor-Trimer mit den gebundenen Liganden sowie den an die aktivierten Todesdomänen gebundenen Proteinen FADD und die Pro-Caspasen trägt aufgrund ihrer Bedeutung für die Initiation der Apoptose die Bezeichnung „Death-inducing signalling complex“(DISC, vgl. Abb. 1.1).

Eine weitere Initiator-Caspase ist die Caspase-9, die im Rahmen des mitochondrialen Apoptoseweges aktiviert wird (vgl. 1.3.2). Im Gegensatz dazu werden die Caspase-3, -6 und -7 als „Effektor-Caspasen“ bezeichnet, da sie Degradationsprozesse wie zum Beispiel die Spaltung von apoptose-inhibierenden Proteinen wie den IAP's (vgl. 1.3.3) hervor rufen [13-15].

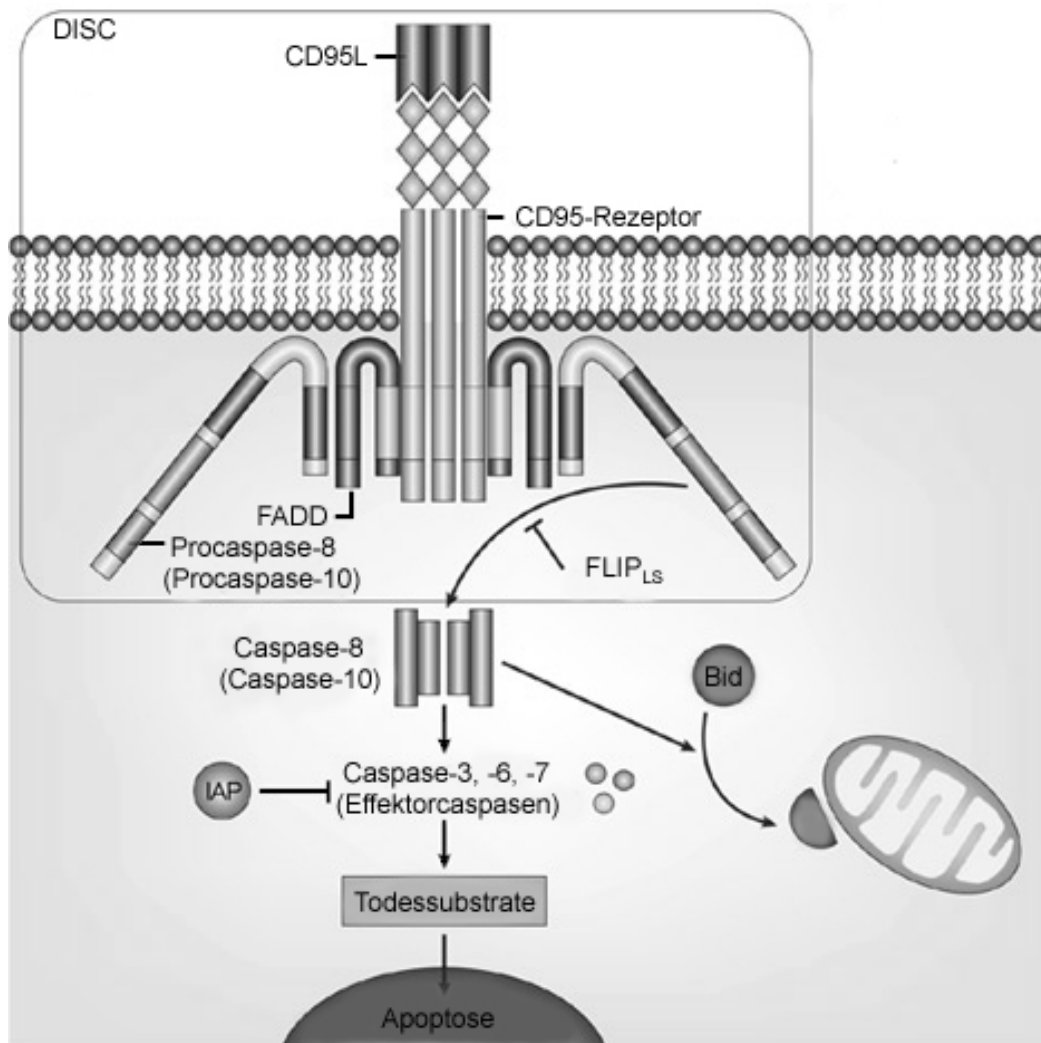
Auf Ebene des DISC kommt es auch zu regulatorischen Prozessen. Dabei wirken sogenannte FLIP's (FADD-like interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme inhibitory proteins) der Apoptose entgegen. Die Inhibition ist kompetitiv, wobei die Splice-Variante FLIP<sub>L</sub> Strukturähnlichkeit mit Caspase-8 hat und daher mit Caspase-8 um die Bindungsstelle an FADD konkurriert. Da FLIP<sub>L</sub> bestimmte für die Caspaseaktivität

nötige Aminosäuren fehlen, wird die Caspase-Kaskade durch Blockierung der FADD-Bindungsstelle unterbrochen. FLIP ist zudem eingebunden in die Regulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, durch dessen Einfluss das Verhältnis der Signalproteine zugunsten nicht- und antiapoptotischer Prozesse verschoben werden kann (vgl. 1.4).

Seit 1998 sind durch Scaffidi et al. [16] zwei unterschiedliche Zelltypen in Bezug auf apoptotische Signalwege beschrieben. In Typ-I-Zellen reicht die Spaltung von Pro-Caspase-8 am DISC aus um direkt die Effektor-Caspase-3 zu aktivieren. In Typ-II-Zellen hingegen ist DISC-Bildung und die Menge aktiver Caspase-8 nicht ausreichend für eine direkte Induktion der Caspase-Kaskade oder aber der direkte Weg zur Aktivierung ist durch Inhibitorproteine (IAP's, s. u.) blockiert. Hier ist die Verstärkung des Signals beziehungsweise dessen Umleitung über Mitochondrien nötig, um den Apoptoseprozess zu initiieren [17].

## 1. Einleitung

---



**Abb. 1.1: Initiierung der apoptotischen Signalkaskade am CD95-Todesrezeptor:** Nach Bindung des trimeren CD95-Liganden kommt es zur Trimerisation der Rezeptoren und Bindung von FADD an die Todesdomänen. Der Komplex aus Pro-Caspase-8, FADD und CD95 wird als DISC bezeichnet und aktiviert die Initiatorcaspasen. Abbildung nach [18].

### 1.3.2 Mitochondriale Amplifizierung und intrinsische Apoptoseinduktion

Wie oben erwähnt können Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Apoptose einnehmen (zusammenfassend [5]). Die entscheidenden Veränderungen auf mitochondrialer Ebene im Rahmen apoptotischer Prozesse ist die Permeabilisierung der äußeren und inneren mitochondrialen Membran. Dies ist messbar anhand des Verlustes an Transmembranpotential über die innere Membran ( $\Delta\Psi_m$ ).

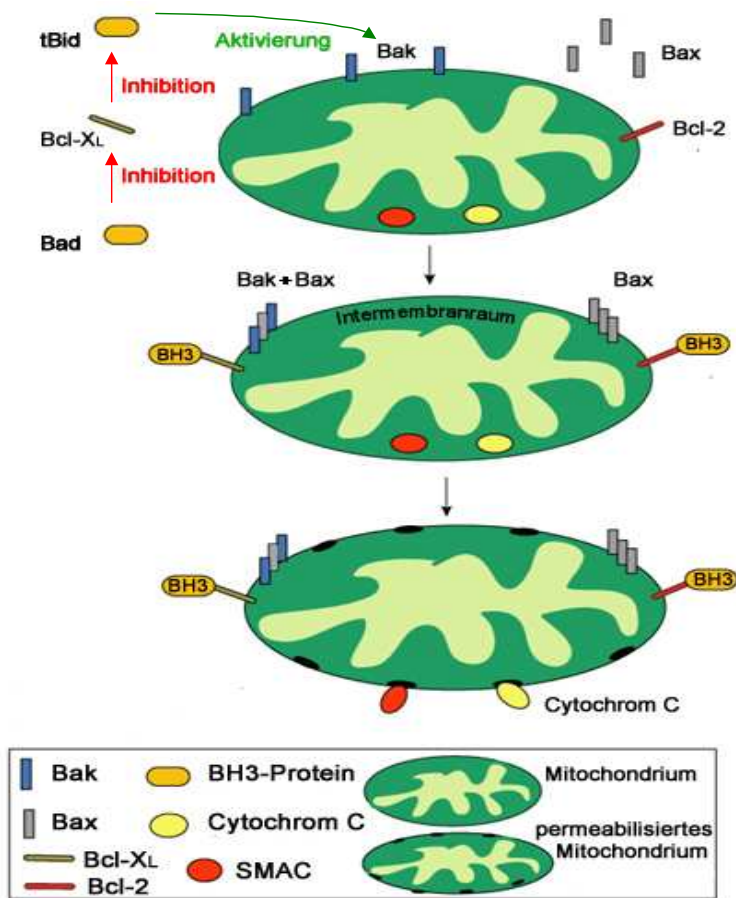
Die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen [5]. Der am ausführlichsten beschriebene

Mechanismus erfolgt über „Bcl-2-Proteine“. Bcl-2 ist der Prototyp dieser Proteinfamilie, denen bestimmte homologe Sequenzen (Bcl-2-Homologie(BH)-Regionen) gemein sind. Diese Proteinfamilie kann in drei Untergruppen unterteilt werden. Diese drei Untergruppen sind die apoptose-inhibierenden Mehrdomänen-Proteine mit 4 BH-Regionen („BH1234“, z.B. Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2), die proapoptotischen Mehrdomänen-Proteine mit 3 BH-Regionen („BH123“, z.B. Bax, Bak), sowie die proapoptotischen Proteine mit einer BH-Region („BH3“, z.B. Bad, Bid). Die BH3-Region, eine  $\alpha$ -Helix-Domäne, ist dabei der wichtigste Mediator der Wirkung [19].

In Typ-II-Zellen ist das Bindeglied zwischen Todesrezeptor und Mitochondrien das BH3-Protein Bid. Dieses Protein kann durch kleine Mengen aktivierter Caspase-8 gespalten werden. Das Spaltprodukt „truncated Bid“ (tBid) kann dann das ebenfalls zur Bcl-2-Familie gehörende BH123-Protein Bax aktivieren. Durch aktiviertes Bax kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (vgl. Abb. 1.2). Dies bedingt die Freisetzung von weiteren Proteinen des Apoptose-Signalweges, wie z.B. Cytochrom C und SMAC/Diablo, aus dem Intermembranraum [5, 20].

Bcl-2, lokalisiert an der zytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran, und Bcl-X<sub>L</sub> wirken den Aktivierungsschritten kompetitiv entgegen, die zur Permeabilisierung führen. Dies geschieht durch direkte Interaktion mit membranständigen BH123-Proteinen oder durch Bindung von BH3-Proteinen [19]. Die BH1234-Proteine können aber auch kompetitiv inhibiert werden. Dabei wird die Bindung an BH123- oder BH3-Proteine dissoziiert und die Bindungsstelle stattdessen durch Bad besetzt.

## 1. Einleitung



**Abb. 1.2: Apoptotische Signalkette am Mitochondrium:** Unter physiologischen Bedingungen findet sich Bax gelöst im Zytosol. Nach Apoptoseinduktion kommt es in Typ-II-Zellen zu Bid-Spaltung. Nach Aktivierung durch tBid wird Bax in die äußere mitochondriale Membran integriert [21] und führt dort, allein oder mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie wie zum Beispiel tBid oder Bak, zu einer Permeabilisierung der Membran. Dies kann entweder durch homooligomere, Bax-beinhaltende Poren oder durch eine Destabilisierung der Lipid-Doppelschicht der Membran (mit Ausbildung von vorübergehenden Diskontinuitäten) geschehen [20]. Durch diese Poren können Substanzen des Intermembranraums in das Zytosol austreten. Bcl-2 und Bcl-XL sind in die äußere mitochondriale Membran integrierte, kompetitive Inhibitoren der proapoptotischen Bcl-2-Proteine. Sie fangen diese mit ihrer BH3-Domäne ab und inhibieren somit die Oligomerisation. Abbildung nach [www.reactome.com/figures/intrinsic\\_pathway.jpg](http://www.reactome.com/figures/intrinsic_pathway.jpg).

Neben der Einbindung in die rezeptorvermittelte Apoptose können auch direkte Einwirkungen von Noxen, zum Beispiel Chemotherapie oder Radiatio, die Mitochondrien ohne Rezeptoreinfluss in eine Apoptose-Signalkette einbinden. Dies geschieht zum Beispiel über die Aktivierung proapoptotischer und Deaktivierung apoptotischer Bcl-2-Proteine durch den Transkriptionsfaktor p53 [5]. Die Apoptose wird somit durch zelleigene Mechanismen und nicht durch Einflüsse von außen initiiert. Daher wird diese Form der Apoptose als intrinsisch bezeichnet. Auch der



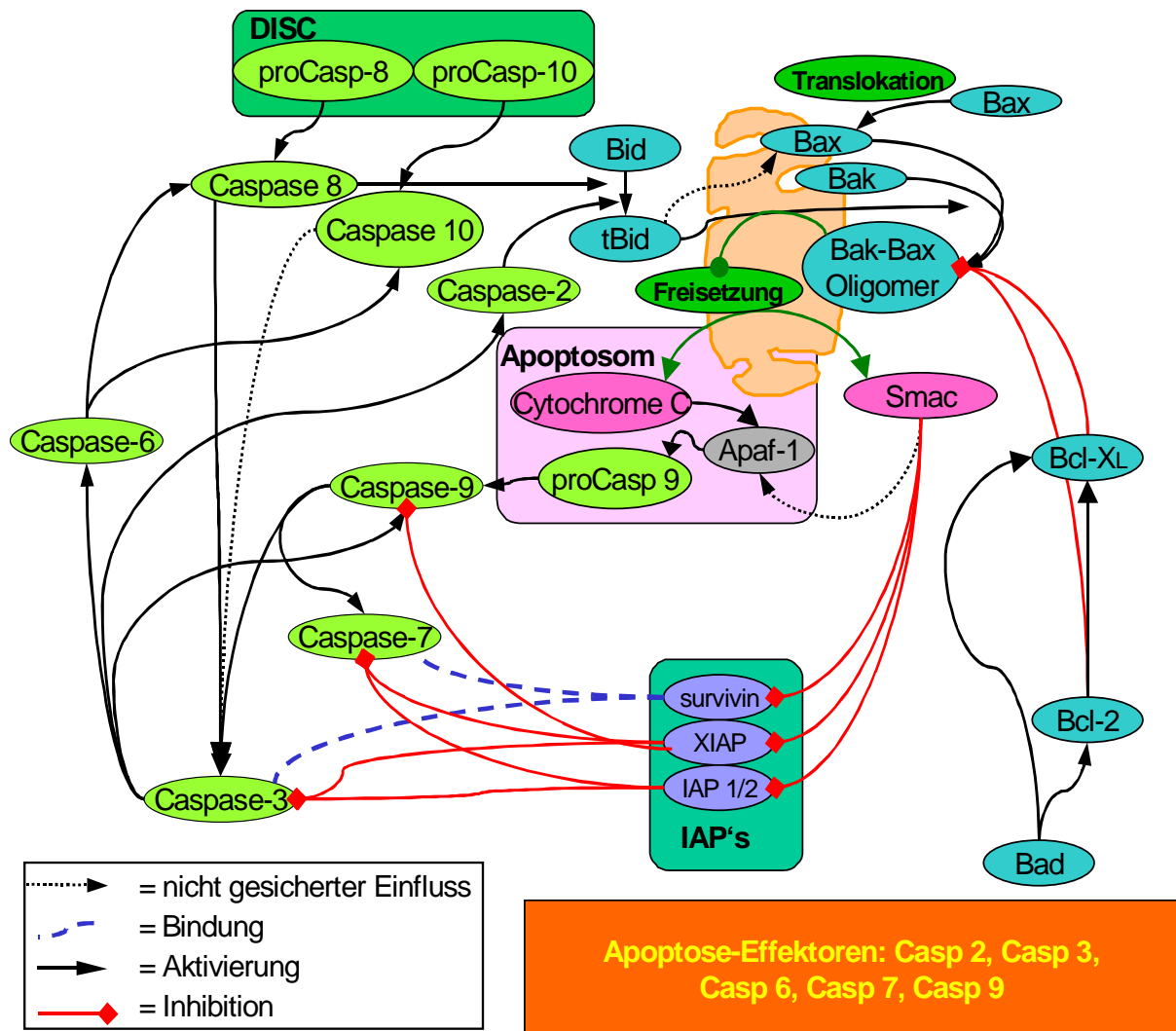
intrinsische Apoptoseweg führt zur Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung von Cytochrom C.

Freigesetztes Cytochrom C bindet an den „apoptotic protease activating factor-1“ (APAF-1) und die Pro-Caspase-9. In diesem Komplex, der „Apoptosom“ genannt wird, erfolgt die Spaltung von Pro-Caspase-9 in seinen aktiven Metaboliten Caspase-9, die als Initiator-Caspase (und damit in ähnlicher Funktion wie Caspase-8) Effektor-Caspasen (hauptsächlich die Caspasen -3, -6 und -7, [15]) spaltet und damit aktiviert [5].

### **1.3.3 Caspasen als Schlüsselenzyme der Apoptose**

Die Effektor-Caspasen initiieren den Zelltod über Inaktivierung anti-apoptotischer Proteine (zum Beispiel von IAP's, s.u.), Herunterregulation von DNA-Replikation und -Reparatur sowie Reorganisation des Zytoskeletts und Zerstörung der Kernmembran, es resultieren DNA-Fragmentation, Blebbing und die Bildung tropfenartiger Abschnürungen von Zellmaterial, sogenannter apoptotischer Körperchen.

Auch der allein durch Caspase-Aktivierung charakterisierte Apoptoseweg ist streng kontrolliert, dabei wurde oben schon auf die Rolle von FLIP hingewiesen. Neben FLIP existiert eine weitere Familie an Regulatorproteinen, die von den inhibitor of apoptosis proteins (IAP's), zum Beispiel cIAP-1, cIAP-2, XIAP und Survivin gebildet wird [22]. Diese Proteine binden an Caspasen und inhibieren deren Wirkung [23]. Einen Überblick über die Rolle verschiedener Caspasen bei apoptotischen und nichtapoptotischen Signalwegen nach der Initiation am DISC gibt Abbildung 1.3.



**Abb. 1.3: Die Caspase-Kaskade, IAP's und ihre Eingliederung in den Apoptose-Signalweg:** Die Caspasen-8, -10 und -9 dienen, aktiviert am DISC bzw. Apoptosom, als Initiatoren der Kaskade. Die Caspase-Kaskade kann durch die Proteine der IAP-Familie inhibiert werden. Nach Destabilisierung der Mitochondrienmembran werden u.a. die Proteine Cytochrom C und Smac freigesetzt. Cytochrom C bildet mit Apaf-1 und Pro-Caspase-9 einen Apoptosom genannten Komplex, der Pro-Caspase-9 in die enzymatisch aktive Form Caspase-9 spaltet und wiederum die Effektor-Caspasen Caspase-3 und -7 aktiviert. Die Effektor-Caspasen werden durch Proteine der IAP-Familie inhibiert, die ihrerseits durch Smac inhibiert werden. Abbildung nach Bentle/Weißmüller, DKFZ Heidelberg.

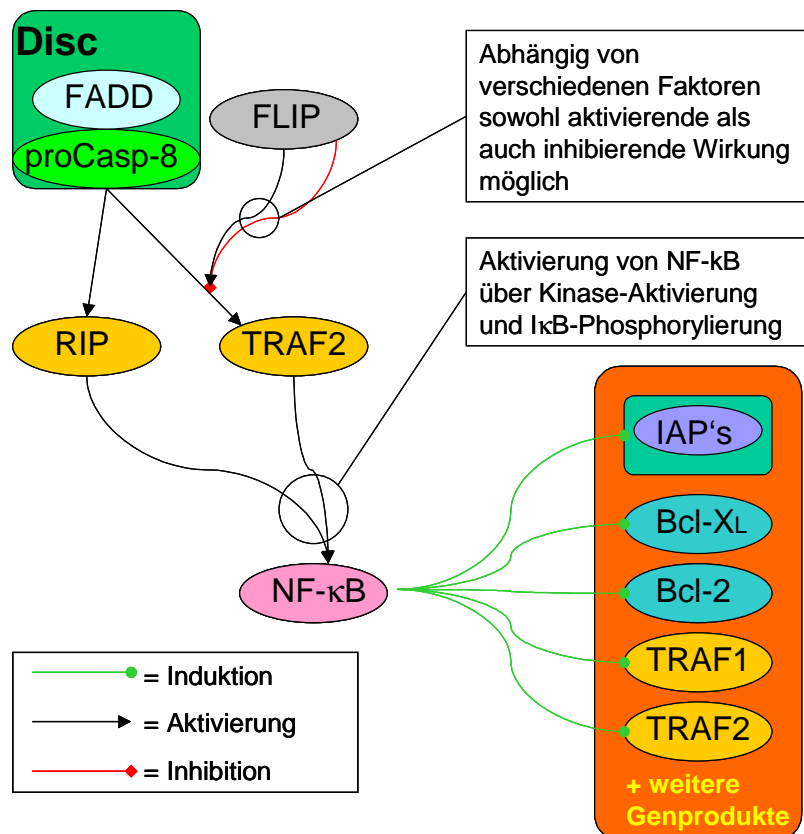
#### 1.4 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg

Neben der apoptotischen Signalkaskade gibt es auch nicht-apoptotische Signalwege nach Aktivierung von Todesrezeptoren. Ein wichtiger, nicht-apoptotischer Signalweg nach CD95-Aktivierung ist die Expressionsveränderung antiapoptotischer Faktoren über die NF- $\kappa$ B-Aktivierung [24]. Wichtig für den Beginn dieser Signalkaskade ist

eine Komplexbildung aus FADD, Caspase-8 und FLIP [25]. Dabei nimmt FLIP<sub>L</sub> verschiedenartig Einfluss auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Beschrieben sind sowohl inhibierende als auch aktivierende Wirkungen [26-28]. Durch Hyer et al. wird diesbezüglich eine Abhängigkeit der FLIP-Wirkung vom relativen Verhältnis verschiedener Proteine eines aktivierenden Komplexes diskutiert. FLIP, FADD und Caspase-8 spielen dabei eine wichtige Rolle sowohl bei Apoptoseinduktion als auch bei Aktivierung proliferativer Signalkaskaden [29].

Über den initialen Proteinkomplex am DISC werden Adaptermoleküle aktiviert, deren Bedeutung erstmals im Rahmen von Interaktionen mit dem TNF-Rezeptor beschrieben wurde. Daher lautet der Name einer dieser Adaptermolekül-Subklassen TRAF's (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor). Ein anderes Adaptermolekül, das über den DISC NF- $\kappa$ B aktivieren kann, ist das Rezeptor-interaktive Protein (RIP). Über diese Adaptermoleküle werden verschiedene Kinasen aktiviert, die im Rahmen einer Signalkaskade schließlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Phosphorylierung des inhibierenden Faktors I $\kappa$ B führen. Eine Übersicht über die Aktivierungsschritte des Signalweges am DISC gibt Abbildung 1.4.

## 1. Einleitung



**Abb. 1.4: Initiierung des NF-κB-Signalweges:** Der Proteinkomplex am aktivierten Rezeptor (DISC, vgl. oben) initiiert direkt (Typ-I-Zellen) bzw. indirekt (Typ-II-Zellen) die Apoptose. Gleichzeitig kann der Komplex über die Rekrutierung von Adaptermolekülen auch zu einer NF-κB-Aktivierung führen. Die Adapterproteine TRAF2 und RIP führen über die Aktivierung spezifischer Kinasen zu einer Phosphorylierung von IκB und damit zu einer Freisetzung von NF-κB. Nach Translokation von NF-κB in den Zellkern werden dort verschiedene Gene aktiviert. Die Genprodukte umfassen in unter anderem anti-apoptotische Proteine und solche, die für die Malignität von Karzinomzellen verantwortlich sind [27]. Abbildung nach [25, 27, 28, 30].

Nach Phosphorylierung von IκB kann NF-κB in den Zellkern übertreten. Dort verstärkt NF-κB als Transkriptionsfaktor unter anderem die Expression der IAP-Proteine cIAP1, cIAP2 und XIAP, aber auch von FLIP, TRAF-1 und TRAF-2 sowie von Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2. Es bewirkt also eine Modifikation der intrazellulären Signalwege, die apoptotischen Prozessen entgegengesetzt wirkt [27, 31].

## 1.5 Zielsetzung

Die Apoptose von Pankreaskarzinom-Zellen ist komplex reguliert. Für ein tieferes Verständnis apoptotischer bzw. nicht-apoptotischer Signalwege und ihrer Vernetzung sind die zeitlichen Verläufe und quantitative Veränderungen der Expression apoptotischer Schlüsselmoleküle von Bedeutung. Eine quantitative und zeitliche Erfassung apoptotischer Veränderungen ist bisher in der wissenschaftlichen Literatur nur in Ansätzen vorhanden [32].

Komplexe Signal- und Regulationswege lassen sich im Computer mit Hilfe mathematischer Modelle simulieren, die zu neuen Erkenntnissen über Regulationsmechanismen führen können. Für solche bioinformatischen Modelle sind initial ebenfalls quantitative und zeitliche Expressionsdaten erforderlich.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden zu diesem Zweck zwei Zelllinien untersucht. Die Zelllinie Panc89 wird dabei als Modellsystem für eine apoptose-resistente Zelllinie verwendet. Colo357 dient als Modellsystem für eine apoptose-sensible Pankreasadenokarzinom-Zelllinie. Es wird nach Stimulation mit einem agonistischen Antikörper gegen den CD95-Todesrezeptor die semiquantitative Expression und der zeitliche Verlauf von 10 exemplarische apoptose-relevanten Proteine untersucht, die an Schlüsselpositionen der Apoptose-Signalkaskade stehen. Auf diese Art kann das apoptotische Signal bis hin zur Aktivierung der Effektor-Caspasen verfolgt werden. Ziel ist es, herauszufinden, inwieweit qualitative und quantitative Expressionsunterschiede die unterschiedliche Apoptosesuszeptibilität der untersuchten Zelllinien widerspiegeln. Dabei sollen sowohl die konstitutive Situation als auch die Veränderungen nach Aktivierung des CD95-Rezeptors analysiert werden. Im Einzelnen sollen dabei folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche Unterschiede der konstitutiven Proteinkonzentration kennzeichnen die untersuchten Zelllinien und inwieweit erklären diese Unterschiede die unterschiedliche Apoptoseresistenz?
2. Welche Unterschiede dynamischer Proteinveränderungen im Rahmen der Apoptose treten auf und sind ein Zeichen für Resistenzmechanismen?

## 1. Einleitung

---

3. Lassen sich aufgrund von konstitutiver Expression und veränderter Dynamik Proteine identifizieren, die besonders für die unterschiedliche Apoptoseresistenz verantwortlich sind?

Da diese Arbeit sich zu großen Teilen auf semiquantitative Western-Blot-Analysen stützt, werden zudem folgende methodische Aspekte untersucht:

1. Welcher Zusammenhang besteht zwischen Bandenintensität des Films nach Chemilumineszenzdetektion und Proteinmenge?
2. Welche methodischen Aspekte müssen definiert und eingehalten werden, um (semi-)quantitative Aussagen über Proteinexpressionen im Rahmen apoptotischer Prozesse zu treffen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

Sämtliche Untersuchungen werden an den mäßig differenzierten, adhärent wachsenden humanen Pankreasadenokarzinom-Zelllinien Panc89 und Colo357 durchgeführt [33]. Kultiviert werden diese Zellen in RPMI 1640-Medium (Gibco) unter Zusatz von 10% (v/v) Fötalem Kälberserum (FCS) und 2mM L-Glutamin (Gibco) sowie 1mM Natrium-Pyruvat (Gibco) in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Anteil bei 37°C. Die Kulturflaschen sind von Sarstedt (nach Bedarf 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup>).

#### **2.1.1 Auftauen kryokonservierter Zellen**

Die Zelllinien werden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei –165°C gelagert. Zur Verwendung für die Versuche werden Zellen folgendermaßen in Kultur gebracht:

Zunächst werden die in NUNC-Röhrchen (Cryotube 1,8ml, NUNC) in FCS mit 10% DMSO gelagerten Zellen im Wasserbad bei 37°C auf ca. 0°C erwärmt. Danach werden die Zellen in ein 15 ml-Röhrchen mit 10 ml Kulturmedium umgefüllt und die Suspension für 5 Minuten bei 400g und Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5 ml (für 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) bzw. 15ml (für 75 cm<sup>2</sup>) bzw. 25 ml (für 175 cm<sup>2</sup>) Kulturmedium resuspendiert. Daraufhin werden die Zellsuspensionen in entsprechende Kulturflaschen gefüllt und weiter kultiviert wie nachfolgend beschrieben.

#### **2.1.2 Kultivierung der Zellen**

Ein Mediumwechsel erfolgt alle 2-3 Tage. Zum Passagieren der Zellen in größere Zellkulturflaschen bzw. Aufteilen der Zellen müssen diese zunächst vom Boden ihrer Kulturflasche gelöst werden. Dies erfolgt durch Zugabe von Trypsin nach Absaugung des Kulturmediums und einmaligem Waschen mit PBS (Gibco). Nach Zugabe von 1ml bis hin zu 10 ml Trypsin (0,5% W/V in 0,2% W/V Na-EDTA, Gibco in PBS-Lösung

## 2. Material und Methoden

---

1:10) je nach Fläche der Flasche und Dichte des Zellrasens werden die Zellen für ca. 15 Minuten zurück in den Inkubator gestellt, die maximale Inkubationszeit beträgt 30 Minuten. Die dann im Trypsin abgelösten und suspendierten Zellen werden in ein 15 ml-Röhrchen überführt und mit der gleichen Menge an Kulturmedium verdünnt. Die Zentrifugation der Suspension erfolgt für 5 Minuten mit 400 x g, danach wird der Überstand abgesaugt und die Zellen in Medium resuspendiert. Im Anschluss werden die Zellen in neue Kulturflaschen gefüllt, 25ml pro 175 cm<sup>2</sup>-Flasche.

### 2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wird der gesamte Well-Inhalt inklusive der jeweiligen Überstände (Medium und PBS aus den Wasch-Schritten) verwendet. Dazu werden 50µl der Proben in je 5ml CASYton-Puffer (Schärfe System) pipettiert. Anschließend erfolgt die Zellzählung mit dem Casy-1 von Schärfe System. Dabei wird die Leitfähigkeit einer Flüssigkeit bei Durchtritt einzelner Zellen durch eine Kapillare gemessen. Aus der Widerstandsänderung können dabei auch Rückschlüsse auf den Durchmesser der Zellen gezogen werden. Dabei können Grenzwerte für die Zählung gesetzt werden. Diese Grenzwerte sind hier errechnete Durchmesser zwischen 10 und 35µm. Alle Zellen mit einem entsprechenden Durchmesser werden gezählt. Jede Probe wird zweimal gezählt und daraus der Mittelwert gebildet.

### 2.1.4 Stimulation des CD95-Todesrezeptors

Zur Induktion apoptotischer und nicht-apoptotischer Prozesse erfolgt zunächst das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wie oben beschrieben. Danach werden die Zellen in 6-Well-Platten überführt, 2,5\*10<sup>5</sup> Zellen pro Well in 2 ml Medium. Es folgt eine Kultivierung für 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen. Danach wird das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt, das zuvor im Wasserbad auf 37°C angewärmt wird. Dem frischen Medium wird zur Induktion der Apoptose der monoklonale anti-CD95-Antikörper CH11 (Immunotech) mit einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben. Dieser Antikörper wirkt am CD95-Rezeptor als agonistischer Ligand und setzt somit die Apoptose in sensitiven Zellen in Gang. Gleichzeitig erhielten in einem Kontrollansatz Zellen lediglich einen Mediumwechsel ohne Zugabe von CH11.



Zu bestimmten Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel bzw. nach Induktion der Apoptose werden die 6-Well-Platten auf Eis gekühlt und die Zellen lysiert. Die entsprechenden Zeitpunkte sind 15 Minuten, 30 Minuten, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h und 24 h. Zudem erfolgt als Nullkontrolle zum Zeitpunkt der Stimulation eine Lyse von Zellen ohne Mediumwechsel.

## 2.2 Proteinanalysen

### 2.2.1 Lyse von Zellen

RIPA-Puffer	PBS (Dulbeco) mit 3,5 mM SDS (Gibco), 1% (v/v) iGEPAL CAG30, 12,1 mM Na-Deoxycholat 1 Tbl. Complete Proteaseinhibitor (Roche) auf 50ml Endvolumen
Homogenisationspuffer	10 mM HEPES, pH 7,4, 142 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 0,2% NP-40

Die Lyse der in Kultur befindlichen Zellen erfolgt mit folgenden Methoden:

#### 2.2.1.1 Lyse der Zellen zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Zellen, deren Proteinzusammensetzung zu den verschiedenen Zeitpunkten mithilfe von Westernblots analysiert werden sollen, werden mit RIPA-Puffer lysiert. Durch die Zugabe eines Proteaseinhibitors (Complete®, Roche) zu diesem Puffer wird in den stimulierten Zellen die Proteindegradation verhindert und somit eine Momentaufnahme der Proteinkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl für Zellen in Apoptose als auch für Zellen nur unter Mediumwechsel-Einfluss möglich.

Dazu werden zunächst die 6-Well-Platten auf Eis gekühlt und das Medium abpipettiert. Danach erfolgt das Waschen der Zellen mit eisgekühltem PBS, 1ml pro

## 2. Material und Methoden

---

Well. Da sich im Laufe der Apoptose die Zellen vom Boden der Wells lösen, werden das Medium der stimulierten Zellen sowie das PBS nach dem Waschen in einem 15ml-Röhrchen gesammelt und bei 400 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Zugabe von 100 µl RIPA-Puffer pro Well. Der Überstand der zentrifugierten Zellen wird verworfen und das Pellet am Boden des Röhrchens mit etwas RIPA Puffer aus dem entsprechenden Well in dieses zurückgegeben. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation in RIPA-Puffer für 10 Minuten. Dadurch wird eine vollständige Lyse von Zell- und Zellkernmembranen bewirkt. Zusätzlich wird der Boden des Wells mithilfe eines Zell-Schabers abgeschabt und in Eppendorfgefäße pipettiert. Die hochmolekulare zelluläre DNA wird mechanisch geschert. Dazu werden die Lysate jeweils 10 Mal rasch durch eine 1 ml-Spritze (Spritzen BD, Kanülen BD Microlance 3, 26G) gezogen. Danach werden die Lysate bei 13000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Im Anschluss erfolgen das Abpipettieren des Überstandes und die Messung der Proteinkonzentration (vgl. 2.2.2).

### **2.2.1.2 Lyse der Zellen zur Bestimmung der Caspase-Aktivität**

Zur Lyse von Zellen für die Caspase-Assays wird wie folgt vorgegangen: Zunächst werden die Überstände abpipettiert und die Zellen mit eisgekühltem PBS gewaschen. Danach werden die Zellen abgeschabt und zu den Überständen gegeben. Die Suspension wird bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert, danach wird das jeweilige Pellet mit 500 µl PBS gewaschen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100 µl Homogenisationspuffer resuspendiert. Der Puffer wird über 15 Minuten inkubiert, dann werden die Proben je 10 Sekunden gevortext. Der Überstand wird nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (13000 x g, 4°C für 15 Minuten) für die Caspase-Aktivitäts-Assays genutzt (vgl. 2.2.6). Zudem wird im Überstand die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 2.2.2).

Sämtliche Lysate werden bis zu ihrer Verwendung bei –80°C in Eppendorf-Gefäßen (0,5 oder 1,5ml) gelagert.

### 2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (PIERCE-Assay)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate erfolgt mit dem BCA Protein Assay Kit (PIERCE). Grundlage für diese photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration ist die Biuret-Reaktion, also die Reduktion von Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ ) durch Proteine in alkalischem Medium. Durch gleichzeitige Anwesenheit von Bichinonsäure (bichinonic acid, BCA) entsteht aus den einwertigen Kupferionen mit zwei BCA-Molekülen ein violetter, wasserlöslicher Chelatkomplex, dessen Lichtabsorption bei 562 nm in einem weiten Bereich mit der vorliegenden Proteinkonzentration korreliert.

Zunächst wird das BCA-Reagenz wie im Protokoll des Herstellers beschrieben angesetzt. Danach werden zunächst 5  $\mu\text{l}$  des Lysates zu 45  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer pipettiert und sorgfältig gemischt. Für die Verdünnungsreihe erfolgt eine 1:2-Verdünnung des im Kit enthaltenen BSA (bovine serum albumine) mit RIPA als Proteinstandard. In weiteren Schritten erfolgen 1:2-Verdünnungen dieses Standards, bis insgesamt 7 Standards vorliegen, mit einer Konzentration von 1 mg/ml bis 15,625  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Im Anschluss wird eine 96-Well-Platte mit je 20  $\mu\text{l}$  Proben befüllt, wobei RIPA-Puffer als Leerwert in Dreifachbestimmung dient. Ebenfalls erfolgen eine Dreifachbestimmung jedes Standards sowie eine Zweifachbestimmung jeder verdünnten Lysat-Probe. Zu jedem befüllten Well werden 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz gegeben und die Platte wird abgedeckt für 30 Minuten bei 60°C inkubiert.

Anschließend wird die Extinktion bei 562 nm mit einem Mikroplatten-Photometer „Sunrise“ (Tecan) bestimmt. Anhand der doppelt logarithmisch aufgetragenen Standard-Verdünnungsreihe können Extinktionswerte mit Proteinkonzentrationen korreliert werden. So erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Lysaten durch Einsetzen der jeweiligen Extinktionswerte in die anhand der Standard-Verdünnungsreihe erzeugte Gleichung.

### 2.2.3 Gelelektrophorese

Laemmlipuffer 4fach

H<sub>2</sub>O dest. mit

0,25 M Tris-Base (Roth)/HCl pH 6,8

## 2. Material und Methoden

---

	138,7 mM SDS (Invitrogen)
	0,25 M DTT
	2,17 M Glycerin
	0,3 mM Bromphenolblau
Laufpuffer	H <sub>2</sub> O dest. mit
	25 mM Tris-Base (Roth),
	192 mM Glycin (Roth),
	3,5 mM SDS aus 10% SDS-Lösung (Invitrogen)

Mithilfe der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine beim Durchlaufen einer Polyacrylamidgel-Matrix im elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine in einem Puffer auf Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate oder SDS)-Basis (hier: Laemmlipuffer) aufgenommen. Dieses anionische Tensid (Detergens) überdeckt die Eigenladungen von Proteinen. Dadurch kommt es zur Entfaltung der Proteine sowie zur Aufhebung von Proteinwechselwirkungen. Dem Laemmlipuffer ist noch zusätzlich Dithiothreitol beigefügt, das als reduzierender Stoff Disulfidbrücken aufspalten kann, die zum einen innerhalb eines Proteins auftreten können, zum anderen manche Proteinkomplexe kovalent stabilisieren. Vor der Elektrophorese wird zunächst der Laemmlipuffer 1:4 dem Lysat beigefügt, anschließend erfolgt eine weitere Denaturierung und Aufspaltung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten. Die Trennung erfolgt in einem Gradienten-Fertigel (ProGel-Tris-Glycin-Gel 4-20%, 10 Bahnen; Anamed Elektrophorese GmbH), das in eine mit Laufpuffer aufgefüllte Laufkammer eingespannt wird. Die Lysate werden in die Taschen des Gels gegeben. Eine Tasche wird zudem mit einem farblich markierten Molekulargewichts-Marker gefüllt (Rainbowmarker, Amersham). Die Markerproteine werden ebenfalls während der Elektrophorese aufgetrennt und

ermöglichen somit Bestimmung der Molekulargewichte der im späteren Verlauf mit Antikörpern nachgewiesenen Proteine.

Nach Anlegen einer elektrischen Spannung (120 V für 2-3 Stunden) wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung der positiven Elektrode.

### 2.2.4 Westernblot

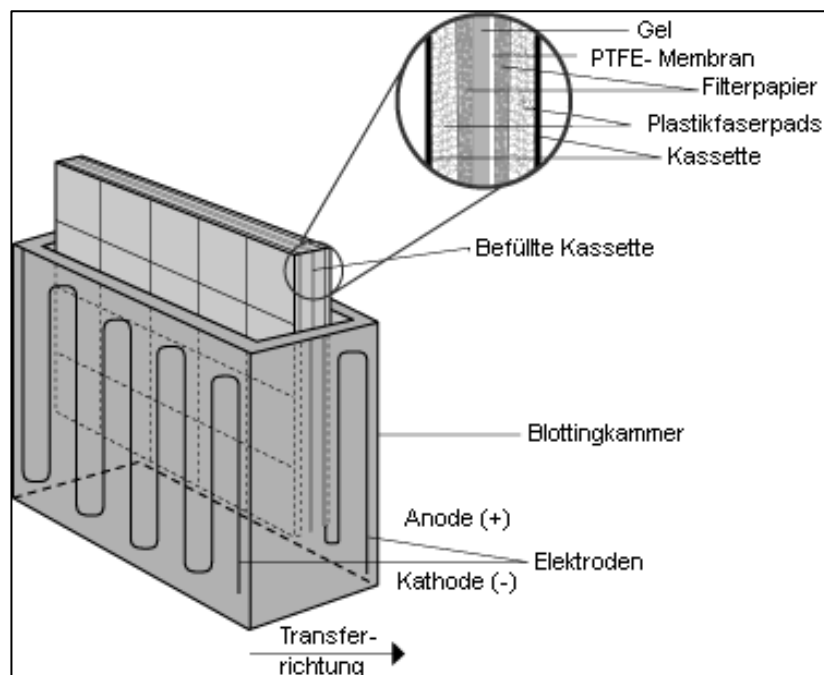
PBS-T	H <sub>2</sub> O dest. mit
(Biochrom)	136,9 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,9 mM CaCl <sub>2</sub>
	10ml/l Tween 20 (Merck)
Blottingpuffer	H <sub>2</sub> O dest. mit
	100 mM Tris-Base (Roth),
	190 mM Glycin (Roth),
	4,9 M (= 20% (v/v)) Methanol (Merck)
Blocking-Puffer	PBS-T mit
	5% (w/v) Magermilchpulver

Die durch die Gelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine können mithilfe des Westernblot-Verfahrens auf eine PTFE-Membran übertragen werden.

Dazu wird zunächst die Plastikhülle, in die das Gel eingebettet ist, eröffnet. Das Gel wird entnommen und in Blottingpuffer equilibriert. Im Blottingpuffer erfolgt dann die

## 2. Material und Methoden

Positionierung des Trenngels auf einer Plastikfasermatte mit Filterpapier (siehe Abb. 2.1). Die für den Transfer vorgesehene PTFE-Membran (Immobilon-P, Milipore) wird zunächst für 30 Sekunden in Methanol equilibriert und dann auf das im Blottingpuffer befindliche Trenngel gelegt. Für gute Ergebnisse beim Transfer ist es essentiell, dass sich zwischen den beiden Schichten keine Luftblasen befinden, da die Proteine nur durch den Puffer auf die Membran übertragen werden können. Um Lufteinschlüsse zu vermeiden erfolgen daher sämtliche Positionierungsschritte unter der Oberfläche des Blottingpuffers. Im Anschluss werden etwaige Lufteinschlüsse zwischen Gel und Membran herausgedrückt. Auf Gel und PTFE-Membran werden dann wiederum Filterpapier und Plastikfasermatte gelegt und alles zusammen in die Transferkassette eingespannt (siehe Abb. 2.1).



**Abb. 2.1: Aufbau eine bestückten Blottingkammer**  
(Abbildung nach [www.piercenet.com/media/PdetectFig24.gif](http://www.piercenet.com/media/PdetectFig24.gif))

Im Anschluss wird die Transferkassette in die Blottingkammer, die vorher schon mit Blottingpuffer gefüllt und im Eiswasserbad gekühlt wird, eingespannt. Bei 400 Milliampere Stromstärke erfolgte dann die Blotting-Prozedur für ca. 2 Stunden. Nach Abschluss des Blottings wird die Transferkassette geöffnet und das Trenngel verworfen.

Es folgt die Inkubation der Membran in Blocking-Puffer für eine Stunde, wodurch die bisher noch nicht mit Proteinen besetzten Anteile der Membran geblockt werden, was eine unspezifische Bindung von Antikörpern in der Matrix der PTFE-Membran im weiteren Verlauf der Analyse unterbindet. Der für die Proteinanalyse jeweils benötigte Antikörper wird gemäß den Herstellerangaben verdünnt, meist 1:1000 (v/v) in PBS-T mit 0,5% (w/v) Magermilchpulver (vgl. Tabelle 2-1).

**Tabelle 2-1: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper**

<u>Antikörper Gegen</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Katalog-Nummer</u>	<u>Hersteller</u>
Bax	Maus	1:1000	610983	Transd. Lab.
Bid	Kaninchen	1:1000	AF846	R&D Systems
Caspase 3	Maus	1:1000	610322	Transd. Lab.
Caspase 8	Maus	1:1000	05-477	Upstate/Biomol
cIAP-1	Kaninchen	1:1000	AF818	R&D Systems
cIAP-2	Kaninchen	1:1000	AF817	R&D Systems
FADD	Maus	1:1000	610399	Transd. Lab.
RIP	Maus	1:1000	610458	Transd. Lab.
TRAF-2	Maus	1:1000	68411A	PharMingen
XIAP	Kaninchen	1:1000	AF822	R&D Systems
Kaninchen-IgG	Schaf	1:5000	NA934V	Amersham
	(sek. Antikörper)			Biosciences
Maus-IgG	Schaf	1:2000	NA931V	Amersham
	(sek. Antikörper)			Biosciences

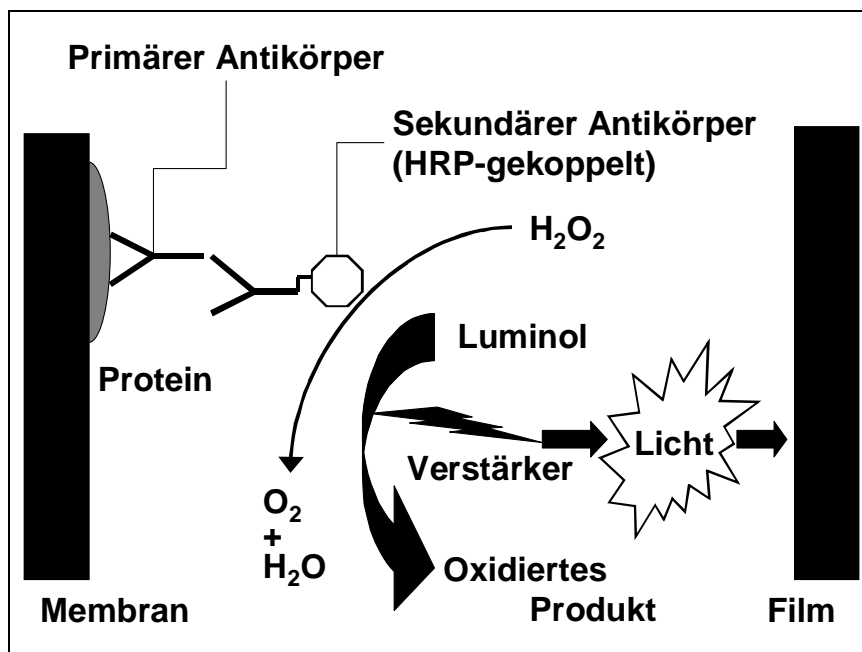
Im Anschluss an die Blockierung der Membran wird diese mit 5 ml des verdünnten primären Antikörpers versetzt, so dass die Membran komplett bedeckt ist. Die Membran wird anschließend entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert. Danach erfolgt ein dreimaliges

## 2. Material und Methoden

---

Waschen der Membran mit PBS-T für jeweils 15 Minuten. Im Anschluss werden die Komplexe aus Protein und primärem Antikörper mithilfe eines gegen den primären Antikörper (Maus bzw. Kaninchen) gerichteten sekundären Antikörpers markiert. An den F<sub>C</sub>-Teil des sekundären Antikörpers ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebunden. Der jeweilige HRP-konjugierte sekundäre Antikörper (verwendet werden die Antikörper gegen Maus-Antikörper und gegen Kaninchen-Antikörper der Firma Amersham Biosciences, vgl. Tabelle 2.1) wird für 1 Stunde inkubiert, ebenfalls verdünnt in PBS-T mit 0,5% Magermilchpulver. Auch nach diesem Vorgang erfolgt dreimaliges Waschen der Membran mit PBS-T für je 15 Minuten.

Die Markierung des Antigen-primärer Antikörper-Komplexes mithilfe des HRP-konjugierten sekundären Antikörpers ermöglicht die Darstellung der entsprechenden Banden mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (vgl. Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Erzeugung von Chemilumineszenz:** Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert den Transfer von zwei Elektronen aus dem Substrat auf Hydrogenperoxid. Dabei entsteht durch Oxidation von Luminol eine angeregte Form von 3-Amino-phosphat. Wenn dieses angeregte Luminol in den Ausgangszustand zurückfällt, wird blaues Licht der Wellenlänge 428 nm ausgesandt, wodurch wiederum ein Röntgenfilm belichtet werden kann. Abbildung nach [34].

Dazu wird auf die Membran nach dem Abwaschen der überschüssigen 2. Antikörper das zuvor nach Herstellerangaben angesetzte Chemilumineszenz-Reagenz (ECL bzw. bei den Proteinen Bax und XIAP das sensitivere ECL plus Western Blotting



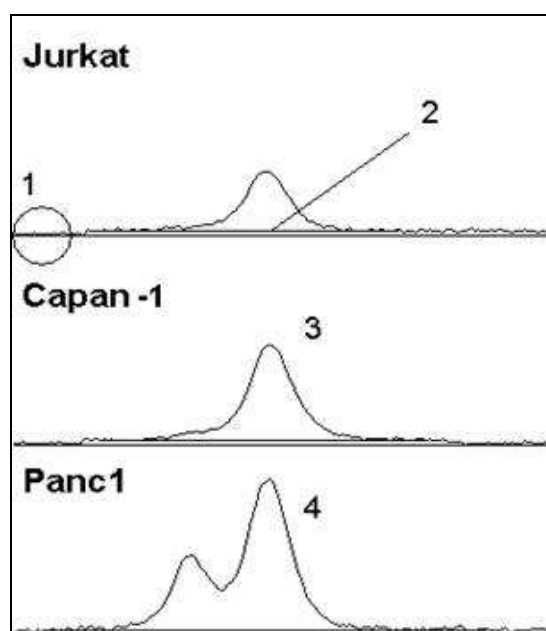
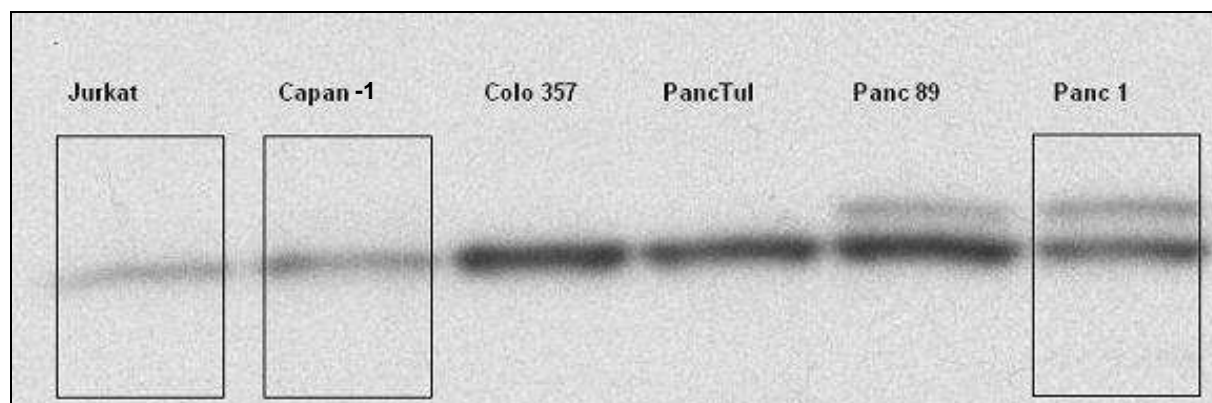
Detection Reagents von Amersham) für 5 Minuten hinzugegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass die gesamte Membran gleichmäßig von dem Reagenz befeuchtet ist, wozu es je nach Zuschnitt ca. 1,5 – 3 ml bedurfte. Die Inkubation erfolgte zwischen zwei Plastikfolien wobei die überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen ausgestrichen werden. Im Anschluss wird der Blot in einer Röntgenkassette auf Röntgenfilm 5 – 300 Sekunden belichtet und danach entwickelt.

### **2.2.5 Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme mit NIH Image 1.62f**

Die entwickelten Röntgenfilme werden im Anschluss densitometrisch Ausgewertet. Des Weiteren erfolgte zudem eine densitometrische Auswertung von bereits qualitativ ausgewertet und publizierten Blots zur konstitutiven Expression der untersuchten Proteine in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien (vgl. Tabellarischer Anhang, [37])

Zunächst werden die Blots im Durchlicht-Modus mit einem Flachbett-Scanner eingescannt und damit digitalisiert. Die Auflösung beträgt 360 ppi und das Grauspektrum 8 bit, also 256 Graustufen (inklusive weiß und schwarz). Die Auswertung der digitalen Bilder erfolgt mit dem Analyseprogramm NIH Image 1.62f (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>), das den Banden nach Dichte und Fläche Zahlenwerte zuweist. Dazu erzeugt das Programm aufgrund von Signalintensität und Bandenstärke Kurven, welche die Schwärzegrade des belichteten Films in Leserichtung widerspiegeln (vgl. Abb. 2.4). Die Zuweisung eines Zahlenwertes für eine Bande erfolgt über die Berechnung der Integrale dieser Kurven zur Basislinie (Graustufen-Hintergrund).

## 2. Material und Methoden



**Abb. 2.3 und Abb. 2.4: Bearbeitung des eingescannten Blot mittels NIH Image 1.62f:** **Abb 2.3** zeigt einen gescannten und digitalisierten Blot. Die Banden stellten sich dar nach Markierung von TRADD mittels ECL. Nachträglich erfolgte die Beschriftung sowie zur Veranschaulichung die Markierung dreier Lanes mittels eines Auswahlrechteckes.

**Abb. 2.4** beinhaltet die zum Blot gehörigen Kurven von Jurkat, Capan-1 und Panc1, wobei die Leserichtung links nach rechts auf dem Blot oben nach unten entspricht, links sind also die Banden von höhermolekularen Proteinen.

**1:** Hier ist die Hintergrundschwärzung am schwächsten ausgeprägt, diese Schwärzung entspricht der Nulllinie. Die Grundschwärzung auf Höhe des Blots liegt höher

**2:** Die dem Grundschwärzung auf Höhe des Blots wird mithilfe einer Linie angepasst

**3:** TRADD-Bande bei Capan-1

**4:** Enge Nachbarschaft zweier distinkter Banden (zur Auswertung solcher Banden vgl. 3.1.1.4)

Mittels eines Auswahlrechtecks wird eine Bande markiert. Breite und Höhe dieses Rechtecks kann frei gewählt werden, ist aber für jede Bande des zu analysierenden Blots gleich. Sind alle Banden markiert, errechnet das Programm für jede Bande aus den Grauwerten der Pixel eine Kurve (vgl. Abb. 2.4). Mittels des Integrals dieser Kurve, entsprechend der Fläche unter der Kurve, wird dann der Bande ein Zahlenwert zugewiesen. Wichtig für eine Analyse ist es zu wissen, dass die Fläche, die am wenigsten Intensität aufweist, als Nulllinie angezeigt wird. Daraus resultiert die Notwendigkeit einer manuellen Anpassung mittels einer eingezeichneten Linie, denn für die meisten Lanes gilt, dass ihre Basisschwärzung über dem Niveau der vom Programm generierten Nulllinie liegt (vgl. Abb. 2.4).

### 2.2.6 Caspase-Assays

Caspase-Assaypuffer	50 mM HEPES pH 7,2, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 0,1% CHAPS
Homogenisationspuffer	10 mM HEPES pH 7,4, 142 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA, 0,2% NP-40
Caspase-3 Substrat	15 mM Ac-DEVD-AMC in DMSO gelöst
Caspase-8 Substrat	15 mM Ac-IETD-AMC in DMSO gelöst
Caspase-3 Substrat	15 mM Ac-LEHD-AMC in DMSO gelöst

Um die Aktivität der Caspasen zu bestimmten Zeitpunkten zu messen, werden den Lysaten Substrate für die einzelnen Caspasen zugegeben. Diese Substrate bestehen aus Tetrapeptiden (im Substratnamen angegeben als 1-Buchstaben-Code; z.B. DEVD, s.o.) mit gekoppeltem Fluorochrom, das in gebundener Form kaum Fluoreszenz zeigt. Durch Spaltung durch spezifische Caspasen wird das Fluorochrom Amino-Methyl-Coumarin (AMC) freigesetzt, das bei spezifischer Anregung bei 380nm eine Emission bei 460nm zeigt. Diese Fluoreszenz kann dann gemessen werden.

Sämtliche Puffer und Substrate sowie die zu untersuchenden Lysate werden bis zum Start der Aktivitätsmessung auf Eis gestellt. Analysiert werden Proben mit je 50µg zytosolischem Protein, mit Homogenisationspuffer auf das gleiche Volumen gebracht, wobei ein Verhältnis Homogenisations- zu Assaypuffer von 1:4 nicht überschritten werden darf.

Es werden dann 100µl Gesamtvolumen (Probe + Assaypuffer) in eine 96-Well-Platte (Fluoronunc (weiß), NUNC) zusammen mit 1µl des entsprechenden Substrates pipettiert (Endkonzentration des Substrates somit 150 µM). Als Kontrolle dienen Probe + Puffer ohne Substrat bzw. Substrat + Puffer ohne Probe. Es erfolgt die

## 2. Material und Methoden

---

Messung der Fluoreszenz-Kinetik in einem auf 37°C vorgewärmten Platten-Fluorometer (Fluoroscanner II, LabSystems and Life Science Int. LTD, UK) alle 2 Minuten für 0,1 Sekunden, 3 Stunden lang. Die Speicherung der Messwerte erfolgt mithilfe des Steuerprogramms Genesis II (LabSystem, UK). Die Werte werden dann in eine EXCEL-Tabelle übertragen. Bestimmt wurde über die Fluorochrom-Emission die Caspase-Aktivität an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Somit ließ sich der Aktivitätsverlauf über den Untersuchungsraum von 24 h abbilden.

### **3 Ergebnisse**

Vor Analyse der Konzentrationsverläufe apoptoserelevanter Proteine im Rahmen der Apoptose ist es nötig, als präanalytischen Komplex die verschiedenen Prozeduren zur Erstellung semiquantitativer Westernblots zu definieren und zu validieren.

#### **3.1 Parameteranalyse für semiquantitative Westernblots**

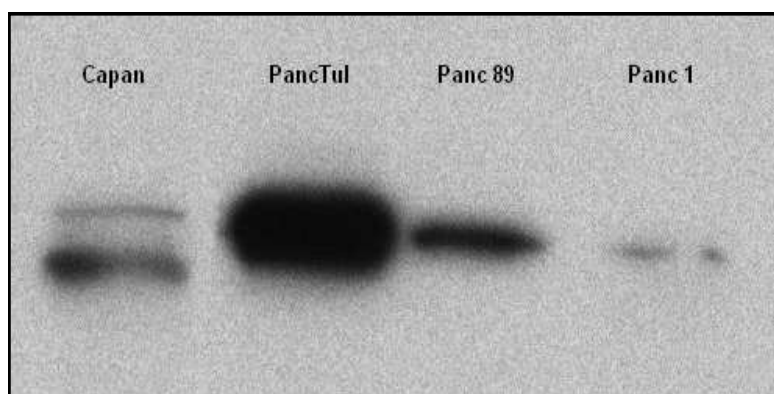
Das Programm NIH Image 1.62f erzeugt aus Blot-Banden aufgrund der Intensität ihrer Färbung Kurven. Die Flächen unter den Kurven können in Zahlenwerte umgerechnet werden. Zunächst wird daher die Korrelation zwischen Proteinkonzentrationen, Bandenintensität und den aus Banden gewonnenen Daten bestimmt. Durch diese Korrelation können dann in den späteren Konzentrationsanalysen Rückschlüsse auf die Veränderung von Proteinkonzentrationen gezogen werden.

##### **3.1.1 Vorgaben für die Mindestqualität von Westernblots**

Neben der Signalstärke einer Bande (Bandenintensität) als Informationsinhalt einer Bande können im Rahmen der Bandenerzeugung/Belichtung des Films verschiedene Artefakte auftreten. Diese Artefakte gehen bei einer Umwandlung in eine digitalisierte Abbildung als eigenständige Information verloren. Daher ist es zunächst nötig, diese Artefakte zu identifizieren und anschließend Qualitätsstandards zu formulieren, die durch Artefakte veränderte Blots aus der Analyse nehmen. Als Beispiel für Artefakte dient Abbildung 3.1

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 3.1: Beispiel für Blot-Artefakte:** Abgebildet ist ein Blot, auf dem mittels ECL in vier verschiedenen Zelllinien das Inhibitor-Protein cIAP2 nach-gewiesen wurde. Hier sind verschiedene Artefakte abgebildet, die bei der Digitalisierung zu falschen oder ungenauen Ergebnissen führen.

#### **3.1.1.1 Bandenintensität**

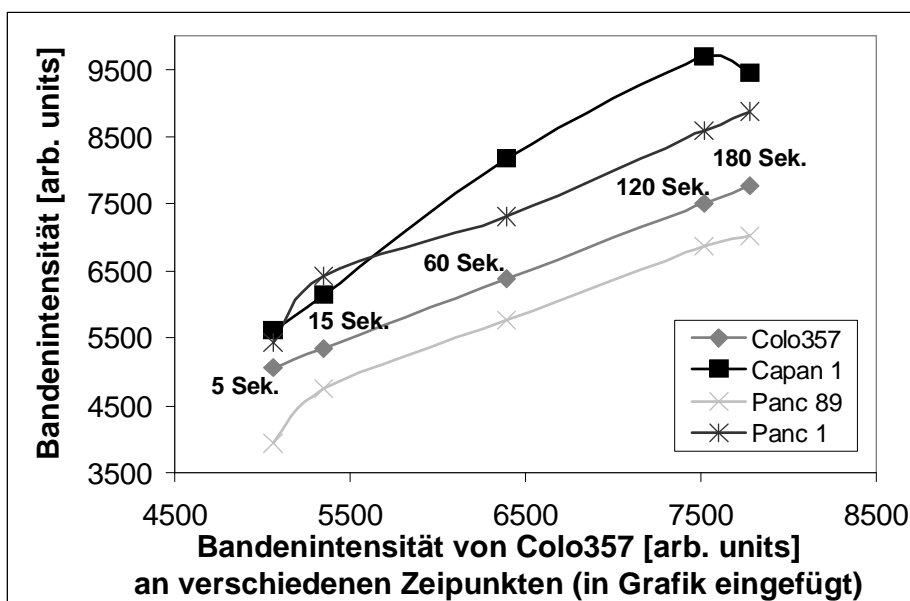
Bei den zunächst durchgeführten Westernblots wird ein weites Spektrum an Intensitäten der Proteinbanden getestet. Damit kann das Dynamik der Intensitätszunahme im Bereich zwischen Nachweisgrenze und Sättigung der Banden überprüft werden. Sehr schwache Banden, die bei Proteinkonzentrationen knapp oberhalb der Nachweisgrenze entstehen sind nur schwierig vom Hintergrund zu unterscheiden. Zudem entstehen inhomogene Banden (vgl. Abb. 3.1, Panc1). Bei zu starken Banden tritt eine Sättigung auf. Sättigung ist hierbei definiert als maximale Bandenintensität, d.h. für ein digitalisiertes Bild mit 8-Bit eine Dichte von 255 [arbitrary units] (maximaler Schwärzegrad). In der Darstellung der Bande mittels NIH Image entsteht dadurch eine Kurve mit Plateau, der Peak wird durch die Sättigung abgeschnitten. Dadurch resultiert in der Integralrechnung ein zu niedriger Wert. Die Bandenintensität ist ein Produkt aus Proteinkonzentration und Belichtungszeit. Sättigung tritt somit auf bei zu hohen Proteinkonzentrationen (vgl. Abb. 3.1, PancTul) und zu langen Belichtungszeiten (vgl. Abb 3.2, siehe unten)

Als Formulierung für die Mindestanforderungen ergibt sich somit, dass alle Banden eines Blots die gleiche Größe und einen homogenen Schwärzegrad haben müssen. Sättigung darf noch nicht aufgetreten sein.

#### **3.1.1.2 Bestimmung der Bandenintensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit**

Da Sättigung als Folge einer zu langen Belichtungszeit auftreten kann muss überprüft werden, ob eine optimale Belichtungsdauer bestimmt werden kann,

beziehungsweise, ob in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer die Verhältnisse der Bandenintensitäten zueinander sich verändern. Bei der Analyse Dynamik der Signalzunahme der Banden in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer zeigt sich, dass verschiedene Banden eines Blots, die unterschiedlich stark sind, dennoch eine gleichmäßige Intensitätszunahme aufweisen. Ein Beispiel für diese Blot-Eigenschaft bietet Abbildung 3.2.



**Abb. 3.2:** Darstellung der Bandenintensität von Pro-Caspase-7 nach verschiedenen Belichtungszeiten in 3 verschiedenen Zelllinien (Panc89, Capan-1 und Panc1) im Verhältnis zur Bandenintensität von Pro-Caspase-7 in Colo357 an diesen Belichtungszeiten. Nach unterschiedlichen Belichtungszeiten (in der Abbildung eingefügt) wurden die Bandenintensitäten nach Digitalisierung mittels NIH Image 1.62f bestimmt und normiert auf die Bandenintensität von Colo357, die hier somit die Abszisse darstellt. So lässt sich zeigen, dass die absolute Intensitätszunahme in nahezu allen Banden gleich verläuft (ersichtlich aus der Parallelität der Linien). Eine Ausnahme bildet Capan1 (vgl. Text).

In Abhängigkeit von zunehmenden Belichtungszeiten nimmt die Bandenintensität von Pro-Caspase-7 in den untersuchten Zelllinien zu. Wird diese Zunahme der Bandenintensität im Verhältnis zur Zunahme in Colo357 gesetzt (wie in Abb. 3.2 ersichtlich), so zeigt eine absolute Intensitätszunahme, die in allen Zelllinien gleich ist, d.h. steigt in einem gewissen Belichtungszeitraum die Bandenintensität von Colo357 um 1000 [arb. units], so steigt auch die Bandenintensität der anderen Proteine des Blots um 1000 [arb. units]. Diese parallele Intensitätszunahme zeigt sich für einen großen Intensitätsbereich und lange Belichtungszeiten.

### 3. Ergebnisse

---

Eine Ausnahme bildet im oben abgebildeten Beispiel Capan-1. Diese Zelllinie hat im Vergleich zu den anderen eine deutlich höhere Konzentration an Pro-Caspase-7. Dadurch entsteht eine überproportional große Bande, die ein deutlich stärkeres Chemilumineszenzsignal abgibt (vgl. zur Veranschaulichung Abb. 3.1, PancTul im Vergleich zu Bandenintensität von Panc89). Dadurch kommt die rasche Intensitätszunahme im Vergleich zu den restlichen Banden zustande. Nach langer Belichtung tritt für einen immer größer werdenden Anteil dieser Bande eine Sättigung ein. Ein maximaler Schwärzegrad von 255 für die einzelnen Pixel des digitalisierten Blots wird somit bereits erreicht, wenn die anderen Banden des Blots noch keine maximale Intensität aufweisen. Auch dieses Beispiel zeigt somit deutlich, dass eine zu große Proteinkonzentration in einzelnen Lysaten die für einen Blot verwendet werden ein Ausschlusskriterium für eine semiquantitative Proteinanalyse darstellt.

Für sehr kurze Belichtungszeiten zeigt sich in der Abbildung 3.2 ein weiteres Artefakt. Zu Beginn des Belichtungsprozesses ist die Intensitätszunahme der Banden nichtlinear. Diese nichtlineare Dynamik der Signalintensität betrifft Belichtungszeiten bis ca. 1 Sekunde. Ein Grund dafür kann in der Handhabung des Röntgenfilms liegen: der Zeitraum von manueller Applikation und manuellem Entfernen des Röntgenfilms von der Membran nimmt im Vergleich zum eigentlichen Belichtungszeitraum einen größeren Anteil ein, womit nicht vermeidbare Variablen in der Applikation – einige Anteile der Membran kommen Bruchteile von Sekunden früher in Berührung mit dem Film – einen größeren Einfluss bekommen. Da diese nichtlineare Intensitätszunahme bei größeren Belichtungszeiten nicht mehr auftritt, ist für die späteren Untersuchungen eine Mindest-Belichtungsdauer anzusetzen. Diese liegt bei ca. 5 Sekunden. Die genauesten Ergebnisse werden bei den untersuchten Proteinen bei einer Belichtungsdauer von 15-30 (-60) s erzielt.

#### **3.1.1.3 Inhomogenität einzelner Banden**

Ein weiteres Problem für die Blot-Analyse stellt die mögliche Inhomogenität des Bandensignals dar, die zum einen bei niedrigen Proteinkonzentrationen auftritt, zum anderen durch Fehler während des Blotting-Prozesses. Beispiele hierfür sind Luftblasen zwischen Gel und Membran, die einen ungleichmäßigen Transfer zwischen Gel und Membran verursachen. Weitere Gründe für Inhomogenitäten sind



der vorzeitige Verbrauch des Chemilumineszenz-Substrates und ungleichmäßiger Lauf des Proteins.

Der durch Inhomogenitäten verlorene Informationsgehalt lässt sich nachträglich nicht ermitteln, daher sind Blots mit jedweder Form von Inhomogenitäten nicht für eine quantitative Analyse verwertbar (vgl. Abb. 3.1, Capan-1).

#### **3.1.1.4 Verschmelzung distinkter Banden**

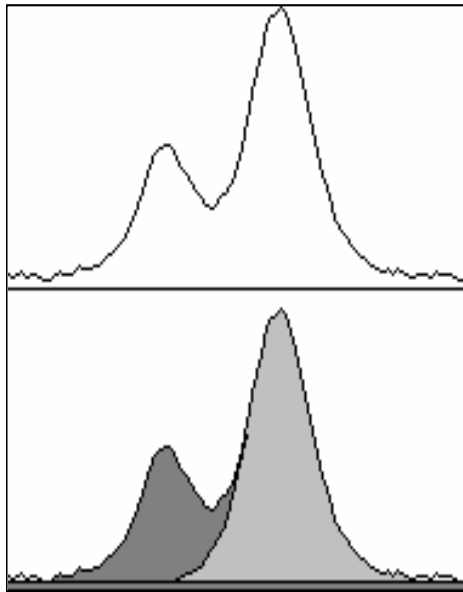
Enge Nachbarschaft von zwei unterscheidbaren Banden kann in Laufrichtung (vertikal) oder quer zur Laufrichtung (horizontal) auftreten. Auf horizontaler Ebene wird diese Nähe zum einen hervorgerufen durch die Diffusion kleiner Proteine (z.B. Survivin) im Gel. Zum anderen entsteht sie bei starken Banden durch Lichtstreuung, so dass die Gelbanden breiter erscheinen als die Breite der Sammeltasche des Gels. Vertikales Verschmelzen entsteht vor allem durch polyklonale primäre Antikörper, die auf einer Bahn mehrere Banden markieren.

Eine horizontale Verschmelzung führt ebenso wie eine überstrahlende Bande zu einer unterschiedlichen Dynamik der Intensitätszunahme und sind daher ein Ausschlussgrund bei der semi-quantitativen Auswertung.

Vertikale Verschmelzungen, wie sich durch Markierung durch polyklonale Antikörper entstehen, sind hingegen kein Ausschlusskriterium. Hier kann unter Annahme einer Gauss'schen Verteilung der Proteine in Laufrichtung der Kurvenverlauf interpoliert werden (vgl. Abb. 3.3).

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 3.3: Trennung von Banden:** Abgebildet ist die Peak-Darstellung zweier Banden nach Markierung mit einem TRADD-spezifischen polyklonalen Antikörper bei der Zelllinie Panc1 (vgl. Abb. 2.4). Oben abgebildet ist der normale Kurvenverlauf. Unten ist zur Veranschaulichung hellgrau markiert der Teil der Peak-Fläche, der in die Messung eingeht. Unter Annahme einer Gauss'schen Verteilung der Proteine und damit der Bandendichte kann die unverschmolzene Seite der Kurve ab dem Peak mithilfe des Zeichen-Tools im Programm NIH Image 1.62f gespiegelt werden. Dadurch entsteht wieder die Gauss'sche Kurve einer singulären Bande.

#### 3.1.1.5 Definition des Qualitätsstandards

Der Qualitätsstandard an die Banden ist gemäß der oben erläuterten Artefakte/Messfehler wie folgt definiert:

1. alle Banden eines Blots müssen die gleiche horizontale Ausdehnung haben
2. die Banden dürfen keine inhomogenen Schwärzegrade aufweisen
3. bei keiner Bande darf eine Sättigung aufgetreten sein
4. horizontale Verschmelzungen dürfen nicht aufgetreten sein
5. vertikale Verschmelzungen müssen einen nachvollziehbaren Kurvenverlauf aufweisen, um diesen zu auf den durch Verschmelzung überlagerten Teil zu spiegeln
6. Die minimale Belichtungsdauer des Films auf dem Blot sollte 5 Sekunden nicht unterschreiten

#### 3.1.2 Verdünnungsreihen und Bandenintensität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Während mithilfe der Analysen der Probelots Standards für die Beurteilung der Analysedaten sowie Vorgaben für den Qualitätsstandard der Banden formuliert

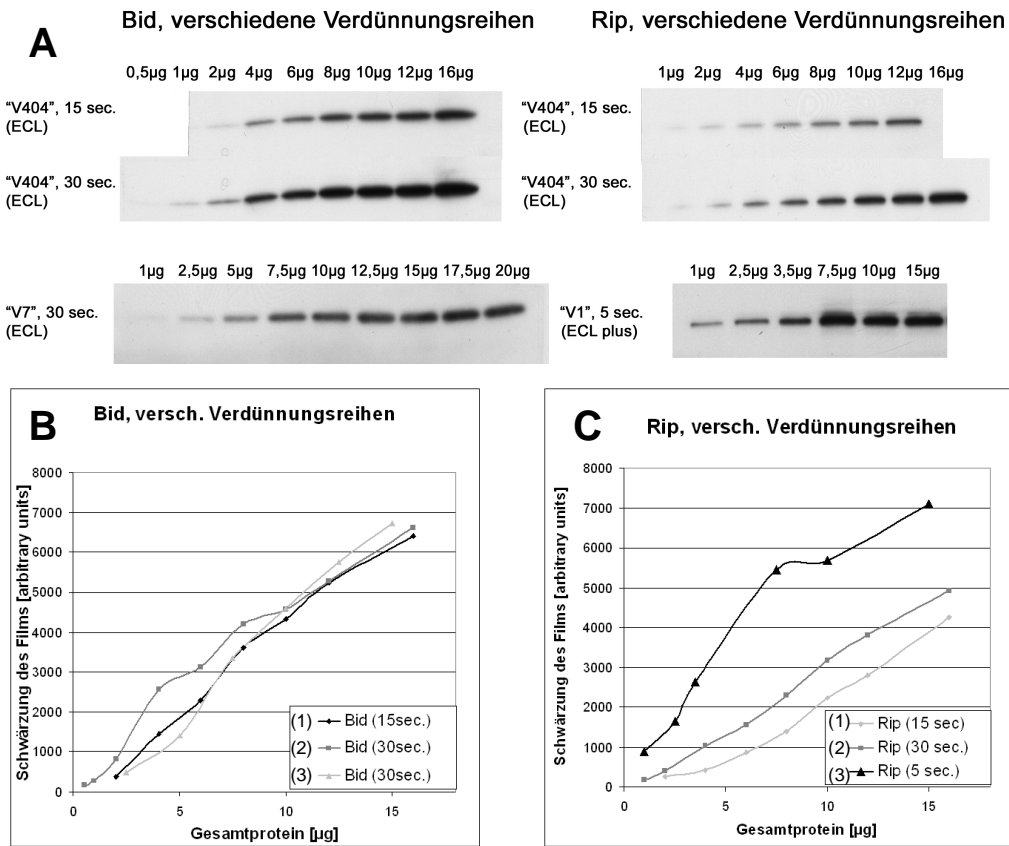
werden können, sind für die Quantifizierbarkeit der Daten Verdünnungsreihen notwendig. Dabei werden die Taschen eines Gels mit unterschiedlich verdünnten Lysaten befüllt. Somit laufen verschiedene Proteinmengen nebeneinander. Dadurch unterscheiden sich auch die Bandenstärken. Mithilfe von Verdünnungsreihen lässt sich der lineare Bereich der Beziehung zwischen Bandenintensität und Proteinmenge beurteilen. Zudem werden dadurch Sättigungseigenschaften bei der Filmbelichtung ermittelt. Anhand dieser Daten kann somit zum einen die optimale Proteinbeladung des Gels bestimmt werden und zum anderen eine Umrechnung der Intensitätsveränderungen der Banden in relative Proteinkonzentrationsveränderungen erfolgen.

Analysiert werden hierbei die Proteine RIP, Bid, Aktin und Survivin. Diese Proteine haben unterschiedliche Molekulargewichte und sind als Bande daher an unterschiedlichen Stellen des Blots sichtbar. Dadurch kann die Dynamik der Signalzunahme in Abhängigkeit vom Molekulargewicht beurteilt werden. Für diese Proteine existieren zudem spezifische Antikörper für die Detektion und die Proteine liegen in einer ausreichend hohen Konzentration im Zytoplasma von Pankreasadenokarzinomzellen vor, so dass sie auch bei starken Verdünnungen nachweisbar sind. Zusätzlich wurden die Verdünnungsreihen mit verschiedenen Chemilumineszenz-Kits nachgewiesen (ECL, ECL plus), um die bestgeeignete Nachweismethode für die nachzuweisenden Proteine zu ermitteln.

#### **3.1.2.1 Bestimmung der Bandenintensität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration**

Um die ideale Proteinbeladung der Geltaschen für die späteren Experimente zu finden, bei der sowohl ein Abfall als auch ein Anstieg der Konzentration des zu untersuchenden Proteins gut detektiert werden kann, wird zunächst in verschiedenen Verdünnungsreihen insgesamt der Bereich von 0,1 – 40 µg Gesamtprotein abgedeckt und analysiert. Dadurch ist es möglich, die Zunahme der Bandenintensität bei unterschiedlichen Proteinmengen abschätzen zu können. Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch verschiedene Verdünnungsreihen, mit Protein-Befüllungen der Geltaschen zwischen 0,5 µg und 20 µg, als Blot und nach densitometrischer Quantifizierung in Diagrammform.

### 3. Ergebnisse

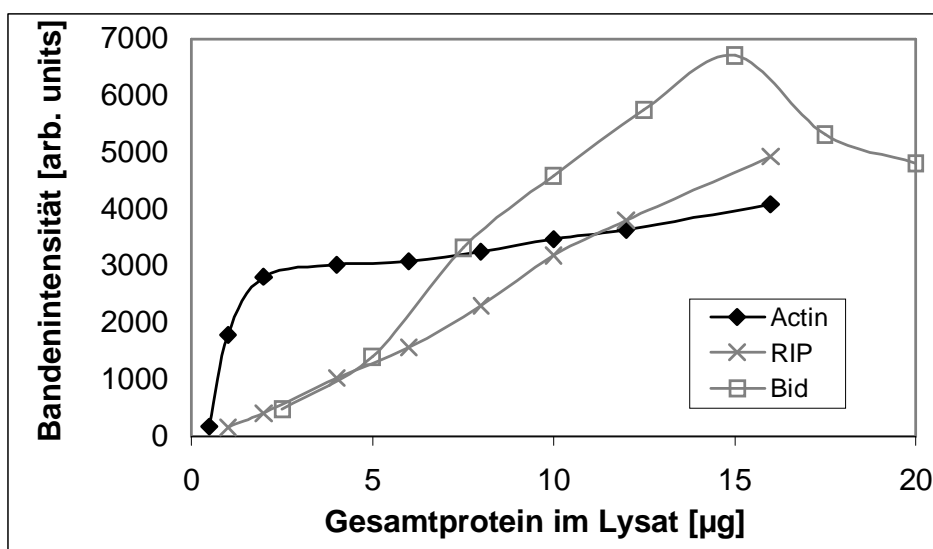


**Abb. 3.4: Nachweis von RIP und Bid:** Darstellung der Bandenintensität nach Chemilumineszenznachweis in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge **A:** Darstellung der Banden auf den Röntgenfilmen. Nachgewiesen wurden die Proteine Bid und RIP. Die die beiden oberen Bilder zeigen die Darstellung eines Blots nach einer Belichtungsdauer von 15 s und 30 s. Die unteren Filmabbildungen zeigen jeweils Blots einer anderen, unabhängigen Verdünnungsreihe. Als Chemilumineszenz-Reagenz dient ECL bzw. ECL plus. **B:** Die Banden von Bid in Darstellung nach Digitalisierung als numerische Werte in einer Grafik. **C:** Die Banden von RIP in Darstellung nach Digitalisierung als numerische Werte in einer Grafik.

Nachgewiesen sind in Abbildung 3.4 die Proteine Bid und RIP. Bei Nachweis mittels ECL-Kit zeigt sich dabei im Bereich von ca. 0,5 µg bis ca. 15 µg Gesamtprotein eine lineare Beziehung zwischen aufgetragener Proteinmenge und resultierender Bandenintensität. Der Korrelationskoeffizient beträgt bei den in Abbildung 3.4 gezeigten Kurven zum Beispiel bei Bid (15 Sekunden Belichtungszeit, Abb. 3.4B1) 0,992, bei RIP (30 Sekunden Belichtungszeit, Abb. 3.4C2) 0,998. Bei Verwendung von ECL plus-Kits ist der Bereich der Linearität schmaler und umfasst bei den untersuchten Proteinen den Konzentrationsbereich von ca. 0,5 µg bis ca. 7,5 µg (Abb. 3.4C3), da bereits ab dieser Gesamtproteinmenge eine Sättigung eintritt.

Bei niedrigen Konzentrationen der nachgewiesenen Proteine Bid und RIP ist keine Linearität mehr gegeben. Es kommt zu einer Überrepräsentation der Banden. Dieser nichtlineare Bereich betrifft allerdings einen schmalen Konzentrationsbereich knapp über der Nachweisgrenze bis ca. 0,5  $\mu\text{g}$  und hat daher keinen großen Einfluss auf die spätere Auswertung der dynamischen Proteinexpression.

Bei höheren Gesamtproteinkonzentrationen zeigt sich für die untersuchten Proteine eine Sättigung mit Abflachung der Intensitätszunahme der Banden und vereinzelt auch geringere Intensität als bei niedrigeren Proteinmengen. Diese Sättigung ist u.a. abhängig von der Menge an Protein in der Bande. Für die in den Verdünnungsreihen nachgewiesenen Proteine Bid und RIP ist die Konzentration im Lysat so hoch, dass bei Nachweis mittels ECL-Kit eine Sättigung ab ca. 15  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein auftritt. Das Strukturprotein Aktin hat einen deutlich höheren Anteil am Gesamtprotein eines Lysats. Daher tritt eine Sättigung schon bei niedrigeren Gesamtkonzentrationen auf (vgl. Abb. 3.5).

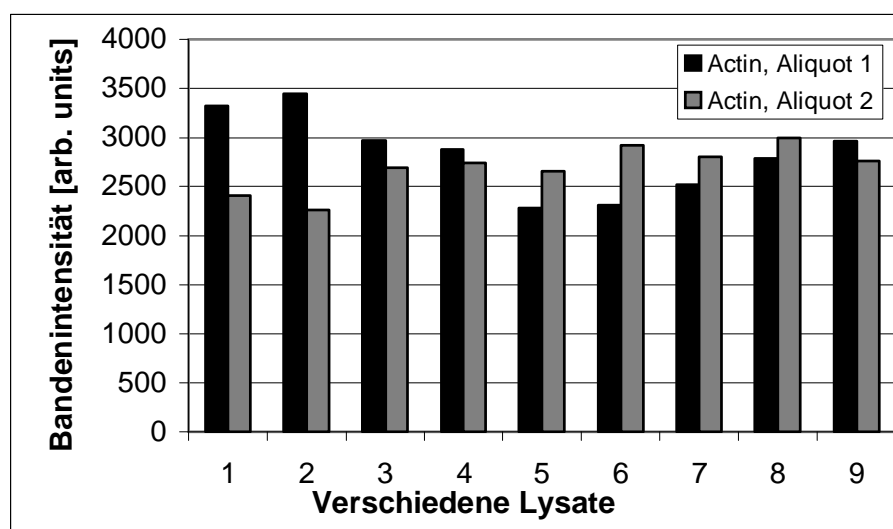


**Abb. 3.5: Nachweis der Sättigung der Bandenintensität in Abhängigkeit von der Gesamtproteinkonzentration bei Aktin, Bid und RIP.** Nachweis der Proteine Aktin und RIP auf dem selben Film. Zusätzlich dazu Nachweis von Bid auf einem zusätzlichen Film zur Darstellung von Sättigungsartefakten bei Konzentrationen über 15  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Als Chemilumineszenz-Kit wurde das ECL-Kit (Amersham) verwendet. Bei Aktin zeigt sich bereits bei 2,5  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein eine Abflachung der Dynamik der Signalintensität, so dass zunehmende Konzentrationen keinen wesentlichen Einfluss mehr auf die Bandenintensität haben. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich für Bid (in diesem Fall sogar mit abnehmender Bandenintensität), allerdings erst ab 15  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Bis 15  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein tritt auch bei RIP keine Sättigung der Banden auf.

### 3. Ergebnisse

---

Die Sättigung des Bandensignals setzt für Aktin bereits bei ca. 2 µg Gesamtprotein ein. Zum Vergleich wird auf dem gleichen Film auch RIP nachgewiesen. Bei diesem Protein tritt die Sättigung erst bei höheren Gesamtproteinkonzentrationen auf. Beim zusätzlich abgebildeten Protein Bid zeigt sich eine maximale Bandenintensität/Sättigung bei 15 µg Gesamtprotein. Die Schwankungen der Bandenintensität, die durch Sättigung bei Aktin-Banden auftreten können, sind exemplarisch in Abbildung 3.6 aufgezeigt.



**Abb. 3.6: Bandenintensität von Aktin in je 2 Aliquots von 9 unterschiedlichen Lysaten:** Abgebildet ist als Histogramm die Bandenintensität von Aktin in 9 unterschiedlichen Lysaten, die jeweils auf 2 Aliquots geteilt wurden. Die beiden jeweils gegenübergestellten Balken repräsentieren dabei die Bandenintensität von Aktin in den beiden Aliquots mit je 10 µg Gesamtprotein pro Aliquot. Es zeigen sich entgegen der Erwartung von nahezu gleichen Bandenintensitäten in den jeweiligen Aliquots teilweise deutliche Unterschiede von > 25 % der Bandenintensität. Als Chemilumineszenz-Kit wurde das ECL-Kit (Amersham) verwendet

Aktinbanden befinden sich bei 10 µg Gesamtprotein in einer Sättigung. Zudem kommt es zu horizontalen Verschmelzungen, d.h. die Banden strahlen über ihre Lauflinie hinaus. Dadurch zeigen sich auch bei aliquotierten Proben aus dem selben Lysat deutliche Schwankungen in der Intensität. Die Intensitätsunterschiede der Aktinbanden weisen dabei Standardabweichungen um den Mittelwert der jeweiligen Bande bis zu 14 % auf (vgl. Tabellarischer Anhang). Diese Schwankungen sind durch Sättigungsartefakte entstanden und bilden sich nicht im Verlauf der dazugehörigen anderen nachgewiesenen Proteine ab.

Als quantitative Standardisierung der Westernblots zur Analyse der dynamischen Expression erscheint Aktin daher ungeeignet. Vielmehr erfolgt bereits vor Gelbeladung eine Standardisierung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (PIERCE-Assay, vgl. 2.2.2). Diese reicht bei guter Bandenqualität bereits als Beladungskontrolle aus. Dies konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden [34]. Die zusätzliche Beladungskontrolle mittels des Strukturproteins Aktin erfolgt daher in erster Linie zur Vervollständigung aufgrund der weiten Verbreitung dieser Methode. Das Aktin-Signal wird aber in dieser Arbeit nicht zur Korrektur der Proteinbeladung herangezogen.

#### **3.1.2.2 Bestimmung von Konzentrationsveränderungen anhand von aus den Verdünnungsreihen abgeleiteten Eichkurven**

In Abbildung 3.4 ist zu sehen, dass zwar eine lineare Beziehung zwischen Konzentrationsveränderungen der Proteine und Bandenintensität besteht, die Steigung der Geraden aber variabel ist. Aus diesem Grund müssen die Steigungen normiert werden. Dividiert man die Steigungsrate der Bandenintensität (in Abbildung 3.4 beträgt die Steigung ca. 370 Einheiten/  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein bei RIP bzw. 460 Einheiten/  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein bei Bid) durch die Intensität bei 10  $\mu\text{g}$ , so erhält man einen Koeffizienten. Dieser Koeffizient lässt sich in allen Verdünnungsreihen darstellen und beträgt im Mittelwert aus allen Verdünnungsreihen 0,106 Einheiten/  $\mu\text{g}$  (Standardabweichung 6,5 %). Der Koeffizient ergibt, multipliziert mit der Ausgangsintensität, die Steigung der linearen Intensitätszunahme des Bandensignals. Mithilfe des Koeffizienten werden in dieser Arbeit im Kontext der einzelnen Ergebnisse Intensitätsunterschiede in Konzentrationsveränderungen umgerechnet. Zum Beispiel beträgt die Steigung bei einer Ausgangsintensität von 3000 Einheiten:  $3000 \times 0,106 = 318$  Einheiten/  $\mu\text{g}$  (+/- 6,5 %). Eine Intensitätsabnahme um 318 Einheiten entspricht als einer Konzentrationsabnahme von 10 %. Diese Linearität gilt wie erwähnt bis ca. 90 % Konzentrationsabnahme, also bis zu einer Bandenstärke von ca. 138 Einheiten. Ebenfalls kommt es bei Konzentrationen über 150 %, in dieser Rechnung also bei Bandenintensitäten über 4500 Einheiten zu einer Abflachung.

### 3. Ergebnisse

---

#### **3.2 Quantitative Konzentrationsverläufe apoptose-relevanter Proteine nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors**

Ausgehend von den vorherigen Experimenten können die Standards für eine semiquantitative Analyse von Proteinkonzentrationen mithilfe von Westernblots definiert werden:

1. Wie oben erwähnt liegt der Bereich der linearen Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Bandenintensität bei 0,5 – 15 µg Gesamtprotein. Da eine dynamische Expressionsveränderung apoptoserelevanter Proteine untersucht werden soll, wird als Ausgangsproteinmenge ein Gesamtprotein von 10 µg pro Geltasche aufgetragen. Die Nachweisgrenze der untersuchten Proteine liegt in den Verdünnungsreihen bei 0,1 – 1 µg Gesamtprotein, der Sättigungsbereich bei > 15 µg. Eine Konzentrationsabnahme von 90 % und eine Konzentrationszunahme bis 50 % kann also sicher linear dargestellt werden.
2. Eine (semi-)quantitative Umrechnung der Bandenintensitätsveränderungen in Konzentrationsveränderungen kann anhand des Koeffizienten der linearen Steigung (0,106/ µg , s.o.) erfolgen.
3. Eine Kontrolle der Proteinbeladung des Gels erfolgt quantitativ über die BCA-Methode („PIERCE-Assay“). Des weiteren erfolgte eine qualitative Kontrolle zusätzlich über die Aktinbanden sowie die Banden der anderen auf dem Blot untersuchten Proteine. Da die Analyse der Aktinbanden somit nur eine untergeordnete Rolle in der Bewertung der Proteinbeladung spielt, wird bei der Abbildung des zeitlichen Verlaufs der jeweiligen Proteinkonzentrationen auf die Aktin-Darstellung verzichtet.

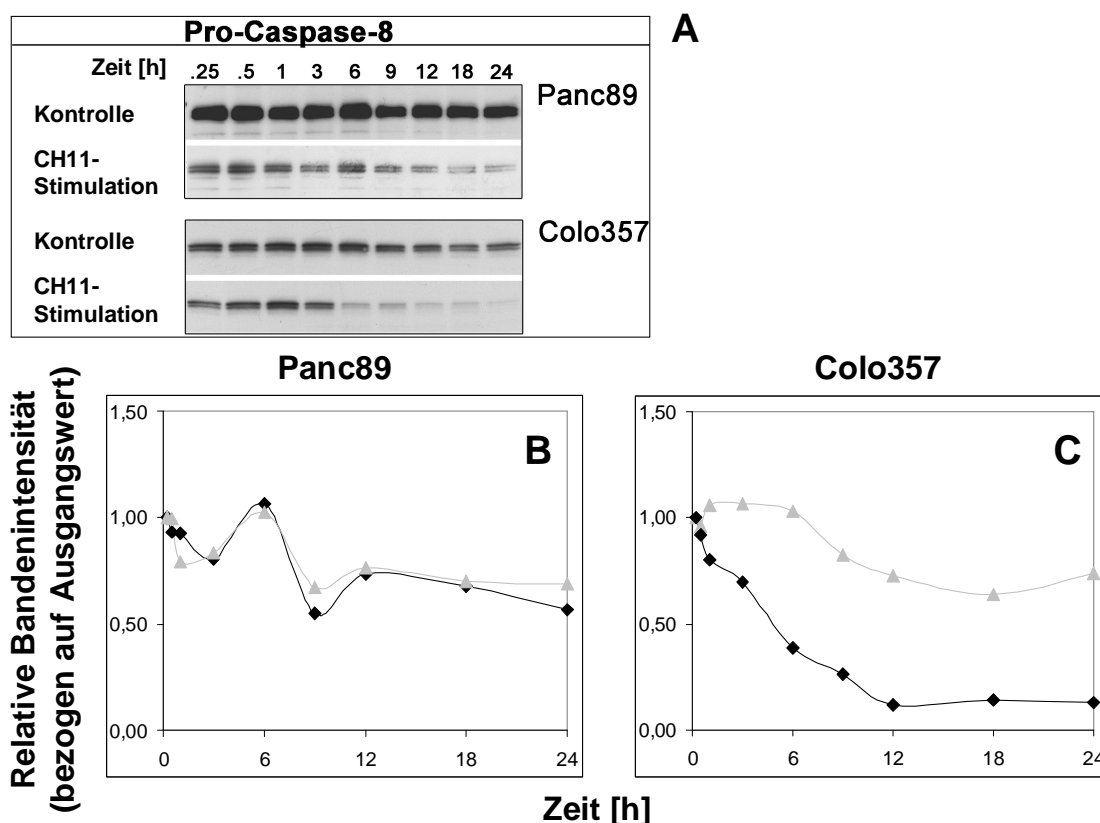
Diese Standards werden im Folgenden auf die Analyse der Veränderungen der Konzentration verschiedener apoptose-relevanter Proteine angewandt.

##### **3.2.1 Pro-Caspasen und Bid**

Von den analysierten Proteinen werden zunächst die Ergebnisse der Analysen derjenigen Proteine präsentiert, deren Spaltung wichtiger Bestandteil der gängigen



Apoptosemodelle ist. Dies sind die Pro-Caspase-8 und Pro-Caspase-3 sowie das Protein Bid, das zur Bcl-2-Familie gehört. Die Spaltung dieser Proteine während der Apoptose lässt sich mit der Westernblot-Analyse gut nachweisen (vgl. Abb. 3.7, 3.8 und 3.9).



**Abb. 3.7: Zeitlicher Verlauf der Expression von Pro-Caspase-8 ohne und nach Stimulation mit CH11** **A:** Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von Pro-Caspase-8 (Doppelbande bei 55/50 kDa) wurden dargestellt durch ECL. **B und C:** Die Auswertung der Blots als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0). CH11-Stimulation zeigt in Panc89 keinen Unterschied des Konzentrationsverlaufs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Im Gegensatz dazu führt eine CH11-Stimulation in Colo357 zu einem deutlichen Konzentrationsabfall an Pro-Caspase-8.

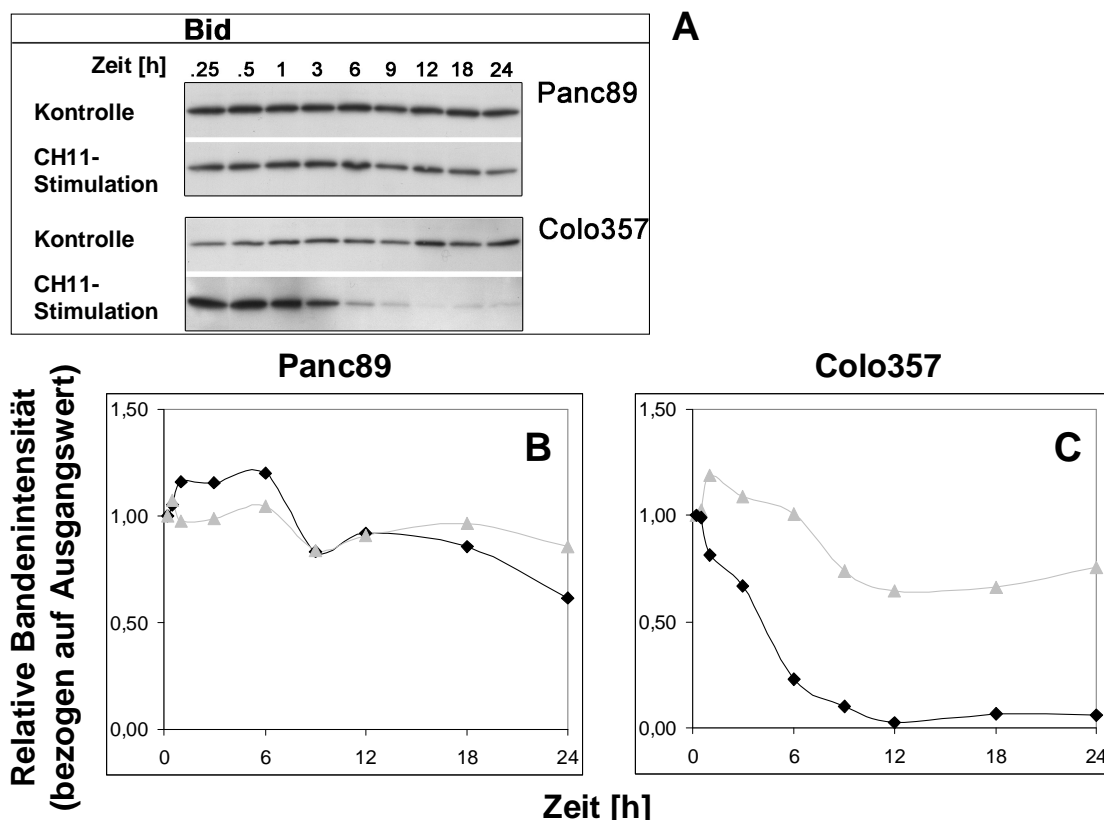
Die Pro-Caspase-8 ist eine der Initiator-Caspasen und wird am CD95-Rezeptor in die aktive Form gespalten. Bei Panc89 lässt sich über die untersuchten 24 h ein Konzentrationsabfall von Pro-Caspase-8 darstellen (vgl. Abb. 3.7). Dabei wird bei 24 h ein relativer Expressionsgrad von ca. 0,7 erreicht. Die entspricht einem Konzentrationsabfall von ca. 30 %. Nach CH11-Stimulation ist der Konzentrationsverlauf bei Panc89 etwas deutlicher abfallend, es resultiert eine

### 3. Ergebnisse

---

relative Bandenintensität von 0,57 als Endwert bei 24 h. Dies entspricht einem Konzentrationsabfall um ca. 40 %. Sowohl bei den unstimulierten Kontrollzellen als auch nach CH11-Stimulation zeigt sich ein zwischenzeitlicher Anstieg der Konzentration bei 6 h mit darauffolgendem Abfall bei 9 h. Dies könnte im Rahmen von Zellproliferationsprozessen auftreten und deckt sich mit den Proliferationsanalysen (vgl. Kapitel 3.3) allerdings nicht mit den Caspase-Assays (vgl. Kapitel 3.4)

Bei Colo357 sinkt bei den unbehandelten Kontrollzellen die Konzentration der Pro-Caspase-8 über den Beobachtungszeitraum leicht ab. Der Verlauf ist ähnlich wie bei Panc89, allerdings ohne die Konzentrationsschwankung bei 6h bzw. 9h. Der relative Expressionsgrad von 0,74 bei 24 h entspricht dabei einem Konzentrationsabfall von ca. 30 %. Nach CH11-Stimulation kommt es zu einem deutlichen Konzentrationsabfall, was auf eine vermehrte Spaltung hindeutet und somit auf eine Initiierung der Caspase-Kaskade. Dabei fällt die Konzentration innerhalb der ersten 12 h nach Stimulation auf relative Werte von weniger als 0,15, was in Korrelation mit den Verdünnungsreihen einem Abfall um ca. 60 – 85 % bedeutet. Die niedrigen Konzentrationen werden bereits bei 12 h erreicht und zeigen dann keine weiteren Veränderungen bis 24 h.



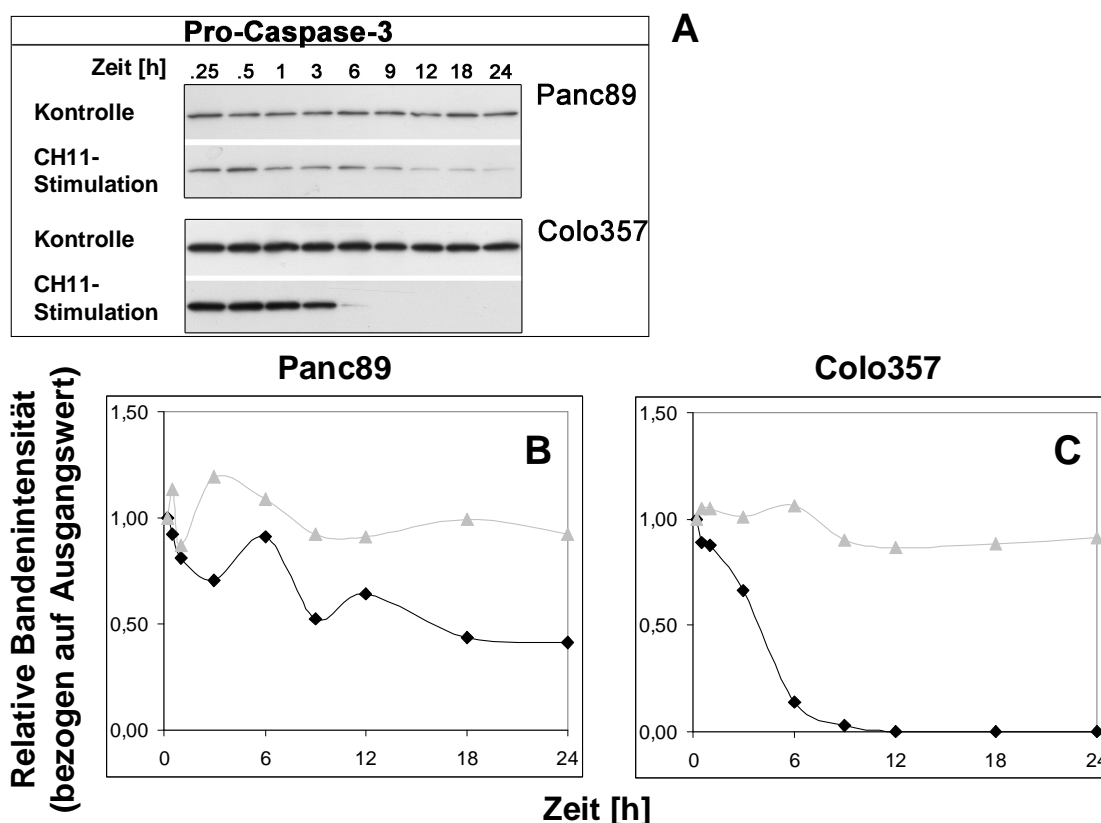
**Abb. 3.8: Zeitlicher Verlauf der Expression von Bid ohne und nach Stimulation mit CH11** A: Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von Bid (22 kDa) wurden dargestellt durch ECL. **B und C:** Die Auswertung der Blots als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0) Bei Panc89 zeigt sich nach CH11-Stimulation ein stärkerer Abfall der Konzentration von Bid von 6h nach 9h als in der unstimulierten Kontrolle. Colo357-Zellen zeigen ebenfalls für diesen Zeitraum einen Konzentrationsabfall an Bid. Nach CH11-Stimulation lässt sich hingegen bereits nach ca. 1 h ein deutlicher Konzentrationsabfall nachweisen.

Ein weiteres untersuchtes Protein ist Bid (vgl. Abb. 3.8), das im Rahmen der Apoptose-Initiation durch Caspase-8 in tBid gespalten wird. Die Konzentrationsverläufe zeigen eine ähnliche Dynamik wie die der Pro-Caspase-8. Bei Panc89 bleibt in den Kontrolllexperimenten ohne CH11-Stimulation die Konzentration an Bid weitgehend stabil, allerdings zeigt sich ein Konzentrationsabfall von 6 h bis 9 h ähnlich wie bei Pro-Caspase-8. Im Rahmen der CH11-Stimulation kommt es zu einem Konzentrationsabfall von ca. 30 % nach 24 h. Zunächst bleibt die Konzentration dabei bis ca. 6 h nach Zugabe von CH11 stabil.

Bei Colo357 zeigen sich in der unstimulierten Kontrolle zunächst bis 6h weitgehend konstante Konzentrationen. Im Verlauf fällt die Konzentration dann aber um ca. 20 %

### 3. Ergebnisse

ab. Nach CH11-Stimulation kommt es bereits nach ca. 30 min zu einem deutlichen Konzentrationsabfall von Bid. Ab 12 h hat Bid die Nachweisgrenze erreicht. Die Konzentration fällt auf relative Werte von unter 0,1 nach 24 h, entsprechend einem Abfall von >80 %.



**Abb. 3.9: Zeitlicher Verlauf der Expression von Pro-Caspase-3 ohne und nach Stimulation mit CH11** **A:** Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von Pro-Caspase-3 (32 kDa) wurden dargestellt durch ECL. **B und C:** Die Auswertung der Blots als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0) In den Kontrollzellen von Panc89 und Colo357 treten jeweils nur Schwankungen um den Ausgangswert auf. Nach CH11-Stimulation kommt es in beiden Zelllinien zu einem Konzentrationsabfall, der allerdings in Colo357 deutlich stärker ausgeprägt ist und zu einem Abfall der Konzentration unter die Nachweisgrenze des Proteins führt.

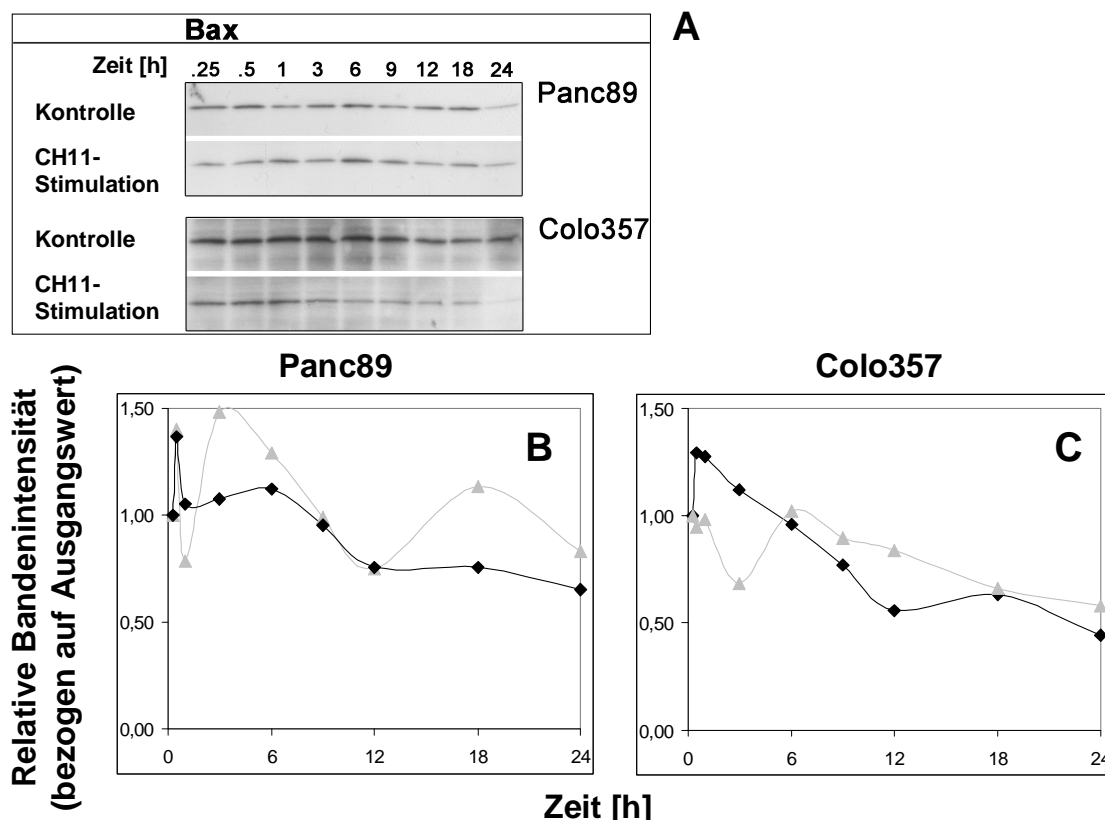
Die Pro-Caspase-3 wird in Typ-II-Zellen vor allem nach Signalverstärkung durch den mitochondrialen Apoptoseweg gespalten und dient als Effektor-Protein der Apoptose. Hier lassen sich die deutlichsten Konzentrationsveränderungen beobachten (vgl. Abb. 3.9). Sowohl bei Panc89 als auch bei Colo357 treten im Rahmen der Kontrollexperimente mit Mediumwechsel lediglich Schwankungen um die Ausgangskonzentration auf. Nach CH11-Stimulation fällt hingegen die Konzentration

der Pro-Caspase-3 um ca. 50 % ab. Bei Colo357 ist die Pro-Caspase-3 ab spätestens 12 h nicht mehr als Bande nachweisbar.

#### **3.2.2 FADD und Bax**

Die Proteine FADD und Bax spielen eine Rolle in der Signalregulierung auf der Ebene zwischen Disc und Mitochondrien. Veränderungen der zytosolischen Konzentrationen dieser Proteine sind auf andere Weise mit apoptotischen Prozessen verknüpft als Pro-Caspasen und Bid. Wichtigstes Merkmal hierbei ist die Tatsache, dass die Proteine FADD und Bax im Laufe der Apoptose nicht durch Spaltung aktiviert werden. Stattdessen translozieren diese Proteine, wobei FADD mit der Death Domain des CD95-Rezeptors interagiert und Bax in die äußere Membran der Mitochondrien integriert wird. In einem Zell-Lysat sind diese Verschiebungen in ein anderes Zell-Kompartiment nicht nachweisbar. Im Rahmen von (anti-)apoptotischen Signalen kann es aber zu einer veränderten Expression kommen (z.B. [35]).

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.10: Zeitlicher Verlauf der Expression von Bax ohne und nach Stimulation mit CH11** **A:** Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von Bax (21 kDa) wurden dargestellt durch ECL. **B und C:** Die Auswertung der Blots als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0). Bei Panc89 zeigen sich in der Kontrolle deutliche Schwankungen der Bandenstärke, so dass keine klare Aussage über Konzentrationsverläufe zu tätigen sind. Nach CH11-Stimulation lässt sich ab 6 h ein Konzentrationsabfall nachweisen. In Colo357 zeigt sich sowohl in den Kontroll-Zellen als auch nach CH11-Stimulation (abgesehen von einzelnen Ausreißern) abnehmende Konzentrationen.

Die Bandendichte beim Nachweis von Bax ist in den Versuchen zum Teil sehr schwach ausgeprägt. Dadurch verursachen geringe absolute Schwankungen große relative Veränderungen. Damit ist die Korrelation zwischen relativer Dichteschwankung und Konzentrationsveränderung eine andere als bei den anderen abgebildeten Proteinen.

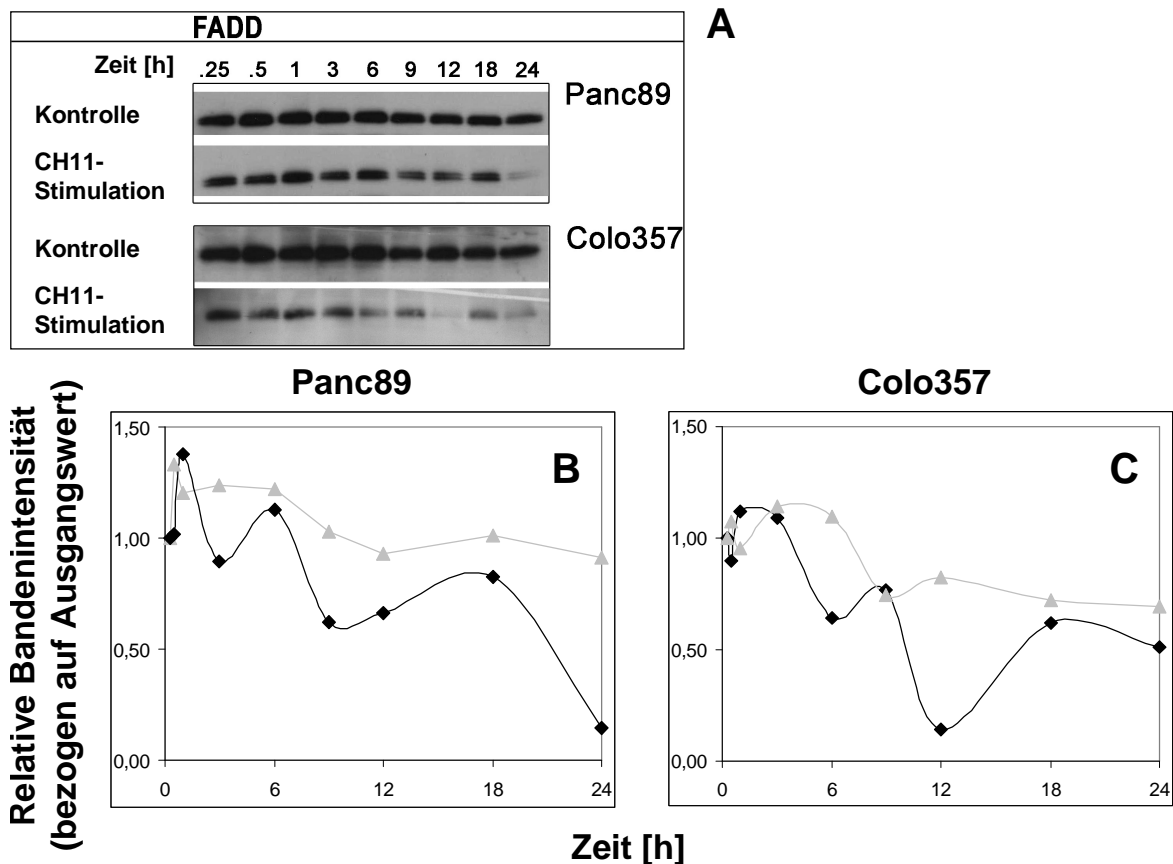
Die unstimulierten Kontrollen von Panc89 zeigen für Bax starke relative Schwankungen der Bandenintensität (vgl. Abb. 3.10). Konkrete Konzentrationsveränderungen lassen sich daher nicht angeben. Auch die CH11-stimulierten Zellen zeigen diese Schwankungen, allerdings weniger stark ausgeprägt.

Nach CH11-Stimulation lässt sich somit ein Konzentrationsabfall um ca. 30 % errechnen.

Schwankungen der Bandenintensität treten zwar auch bei Colo357 auf, betreffen hier aber nur einzelne Werte. Bei Colo357 zeigt Bax für die unstimulierten Zellen eine abnehmende Tendenz der Bandenintensität auf relative Werte um 0,6. Aufgrund der niedrigen Ausgangsdichte entspricht dies einem Konzentrationsabfall um ca. 20 %. Dieser Konzentrationsabfall ist deutlicher ausgeprägt bei den CH11-stimulierten Zellen, wo ein kontinuierlicher Abfall zu verzeichnen ist (der initiale Wert wird als Ausreißer gewertet). Der Konzentrationsabfall liegt bei > 50 %.

Der nachgewiesene Konzentrationsabfall von Bax in Panc89 und Colo357 lässt sich durch eine Minderexpression nach Mediumwechsel erklären [35].

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.11: Zeitlicher Verlauf der Expression von FADD ohne und nach Stimulation mit CH11** **A:** Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von FADD (24 kDa) wurden dargestellt durch ECL. **B und C:** Die Auswertung der Blots als Diagramm ( $\blacktriangle$  Kontrolle,  $\blacklozenge$  CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0). Bei den unstimulierten Zellen von Panc89 und Colo357 zeigen sich jeweils leicht abnehmende Konzentrationsverläufe. Bei den stimulierten Zellen der beiden Zelllinien sind stärkere Schwankungen der Bandendichte zu verzeichnen, der Verlauf ist aber ansonsten mit demjenigen der jeweils unstimulierten Kontrollen vergleichbar.

Für FADD zeigt sich, dass die unstimulierten Zellen bei Panc89 einen kontinuierlichen Konzentrationsabfall um ca. 25 % aufweisen (vgl. Abb. 3.11, B). Nach CH11-Stimulation weisen die Blots teils große Schwankungen der Bandendichte zu den einzelnen Zeitpunkten auf. Ein klarer zeitlicher Ablauf der Konzentrationsentwicklung lässt sich dabei nicht erkennen.

Der Konzentrationsverlauf von FADD ist bei Colo357 in den unstimulierten Zellen ähnlich wie in den unstimulierten Zellen bei Panc89. Der Konzentrationsabfall beläuft sich dabei ebenfalls auf ca. 25 - 30 %. Auch bei Colo357 weist der Konzentrationsverlauf von FADD bei den CH11-stimulierten Zellen deutliche

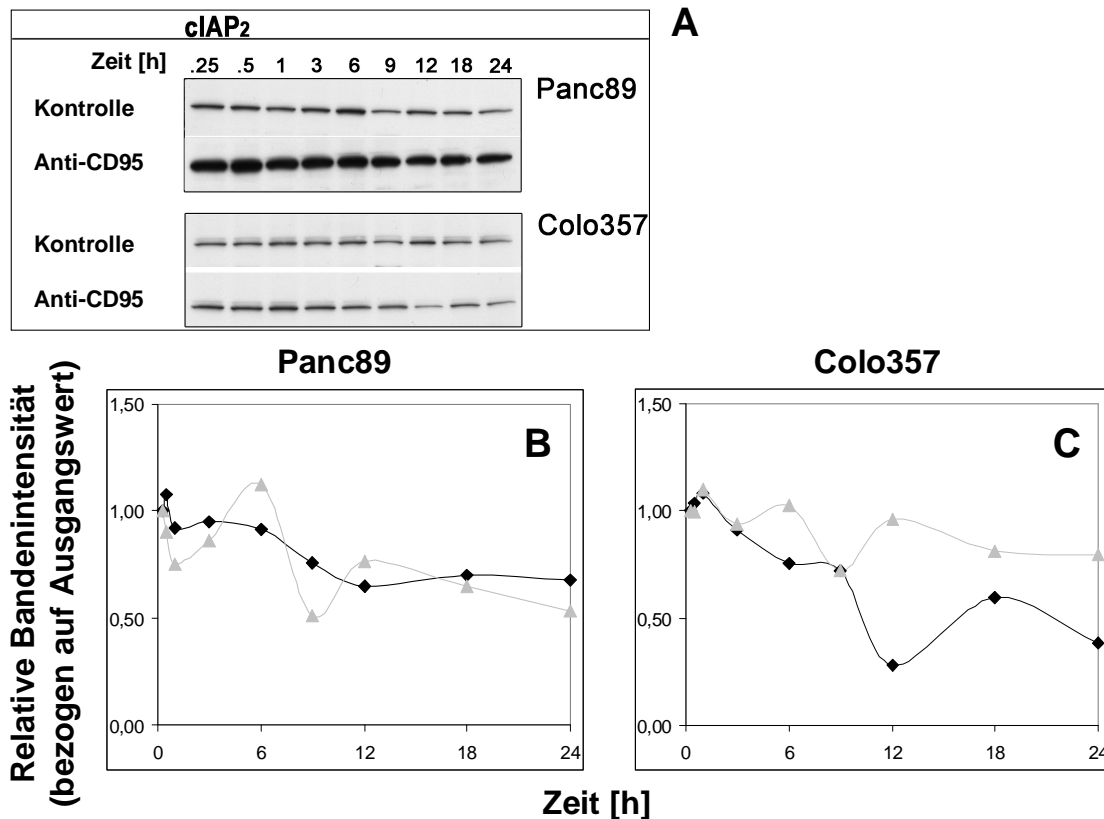


Schwankungen auf, verhält sich aber ansonsten ähnlich wie bei den unstimulierten Zellen.

### **3.2.3 Die Apoptose-Inhibitor-Proteine (cIAP1, cIAP2, XIAP)**

Die im Weiteren untersuchten Inhibitor-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation. IAP's inhibieren die apoptotische Wirkung der Caspasen über eine Bindung an diese. Sie werden dabei nicht durch Spaltung in ihrer Aktivität reguliert wie die Caspasen oder Bid, daher sind Veränderungen in der Konzentration dieser Proteine als nicht spezifisch für den Apoptoseprozess zu betrachten. Vielmehr können gemessene Konzentrationsänderungen Hinweise auf Veränderungen im Rahmen der fortgeschrittenen Apoptose oder Expressionsveränderungen auf Genebene nach Rezeptorstimulation geben. Eine genauere Betrachtung erfolgt zu diesem Zweck in Kapitel 4.

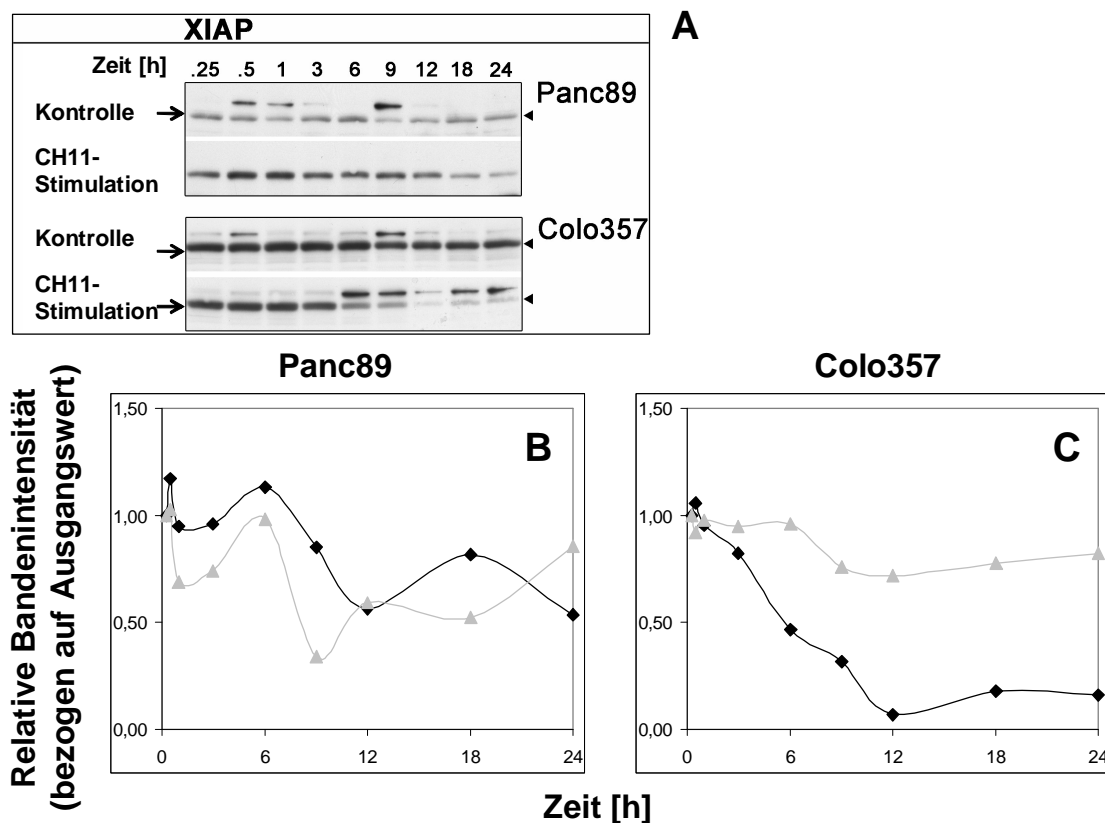
### 3. Ergebnisse



**Abb. 3.12: Zeitlicher Verlauf der Expression von cIAP2 ohne und nach Stimulation mit CH11** **A:** Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von cIAP-2 (66 kDa) wurden dargestellt durch ECL. **B und C:** Die Auswertung der Blots als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0); jeweils mit gleichfarbigen Trendlinien (Polynom). Es zeigen sich Dichteschwankungen einzelner Banden. Bei Panc89 lässt sich ein ähnlicher Verlauf der Proteinkonzentration zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen zeigen. Bei Colo357 kommt es nach CH11-Stimulation zu einem kontinuierlichen Konzentrationsabfall

Der Verlauf der Konzentrationsentwicklungen bei den Zellen der Zelllinie Panc89 ist zwischen den unstimulierten Zellen und den CH11-stimulierten ähnlich (vgl. Abb. 3.12). Dabei lässt sich ein leichter Abwärtstrend verzeichnen, der sich kontinuierlich fortsetzt. In der ersten Stunde nach Mediumwechsel bzw. Stimulation lassen sich allerdings in den Versuchen stärkere Schwankungen beobachten. Die tatsächlichen Konzentrationsänderungen sind ähnlich mit einem leichten Abfall bis ca. 12 h (in der Kontrolle < 25 %, in den CH11-stimulierten Zellen < 20 %), gefolgt von gleichbleibenden Konzentrationen.

Colo357-Zellen zeigen in den Versuchen keinen größeren Konzentrationsabfall von cIAP2 auf Mediumwechsel (maximal ca. 15 %). Nach CH11-Stimulation folgt ab 1 h ein kontinuierlicher Abfall der Konzentration um > 30 % (– 50 %).



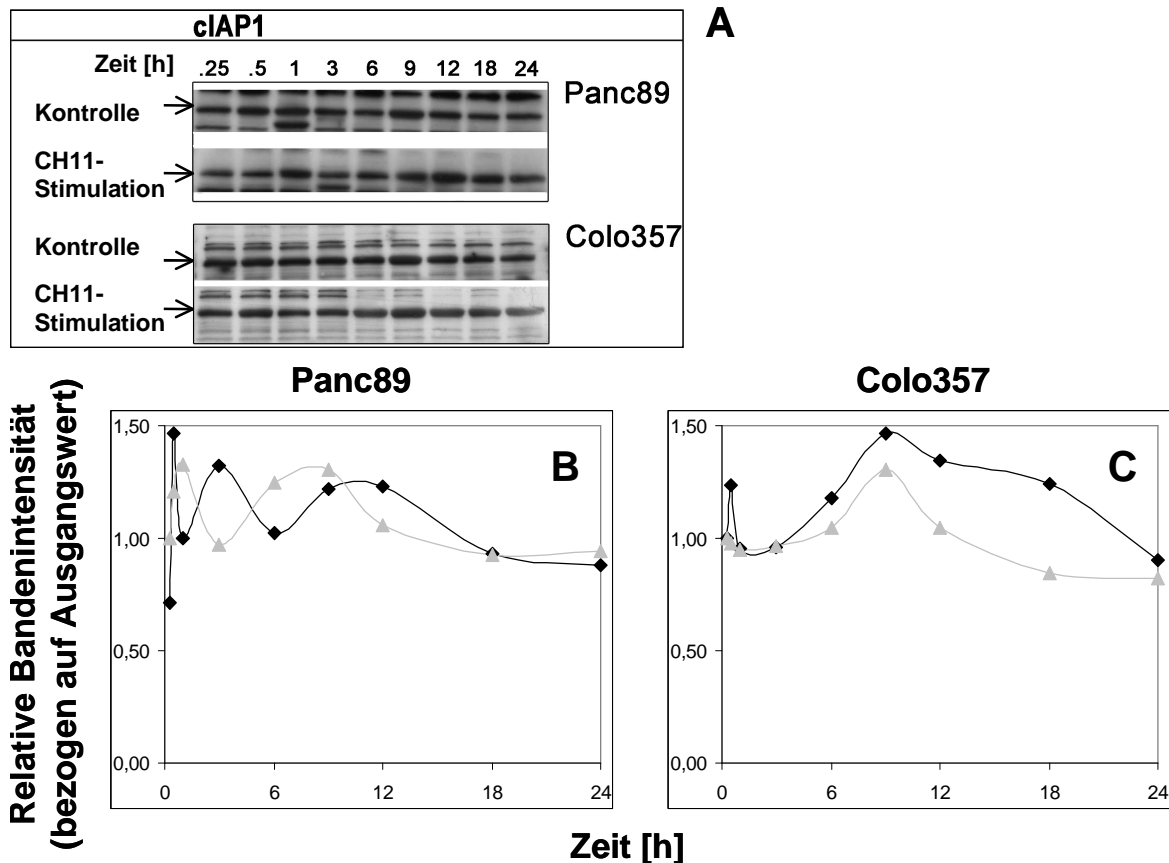
**Abb. 3.13: Zeitlicher Verlauf der Expression von XIAP ohne und nach Stimulation mit CH11** **A:** Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von XIAP (47 kDa) wurden dargestellt durch ECL. **B und C:** Die Auswertung der Blots als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0) ; jeweils mit gleichfarbigen Trendlinien (Polynom). Bei Panc89 zeigen sich ausgeprägte Dichteschwankungen einzelner Banden, die eine Verlaufsbeurteilung erschwert. Bei Colo357 kommt es nach CH11-Stimulation zu einem deutlichen kontinuierlichen Konzentrationsabfall bis 12 h.

Auch bei XIAP zeigen sich in Panc89-Zellen zum Teil starke Schwankungen der Bandenintensität, die eine Verlaufsbeurteilung erschweren. So zeigt sich zwar sowohl für nicht-stimulierte als auch für stimulierte Zellen ein Trend zu einer Dichteabnahme im Verlauf über 24 h, diese lassen sich aber nicht zuverlässig in Konzentrationsveränderungen umrechnen.

Bei Colo357 bleibt die Konzentration von XIAP in den unstimulierten Zellen annähernd auf dem Ausgangsniveau (maximal 15 % Konzentrationsabnahme). Bei

### 3. Ergebnisse

den CH11-stimulierten Zellen kommt es hingegen zu einem deutlichen Konzentrationsabfall auf Werte unter 0,2 der Ausgangskonzentration, entsprechend einem Konzentrationsabfall um 40 %. Damit sind die Verläufe mit denen von cIAP2 vergleichbar (vgl. Abb. 3.12, C), allerdings ist der Konzentrationsabfall nach CH11-Stimulation bei XIAP deutlicher.



**Abb. 3.14: Zeitlicher Verlauf der Expression von cIAP1 ohne und nach Stimulation mit CH11** A: Abgebildet sind die gescannten Westernblots. Die Banden von cIAP-1 (72 kDa) wurden dargestellt durch ECL. B und C: Die Auswertung der Blots als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0) ; jeweils mit gleichfarbigen Trendlinien (Polynom). Bei Panc89 zeigen sich ausgeprägte Dichteschwankungen einzelner Banden, die eine Verlaufsbeurteilung erschwert. Bei Colo357 kommt es sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zellen zu einem zwischenzeitlichen Konzentrationsanstieg. Der Konzentrationsverlauf unterscheidet sich damit deutlich vom dem Konzentrationsverlauf von cIAP2 und XIAP.

In der Zelllinie Panc89 zeigen sich in den ersten 3 h Schwankungen der Bandenintensität von cIAP1 um den Ausgangswert sowohl in den unstimulierten als auch in den stimulierten Zellen (vgl. Abb. 3.14, B). Für diesen Zeitraum ist daher eine gleichbleibende Expression von cIAP-1 anzunehmen. Ab 9 h zeigt sich ein

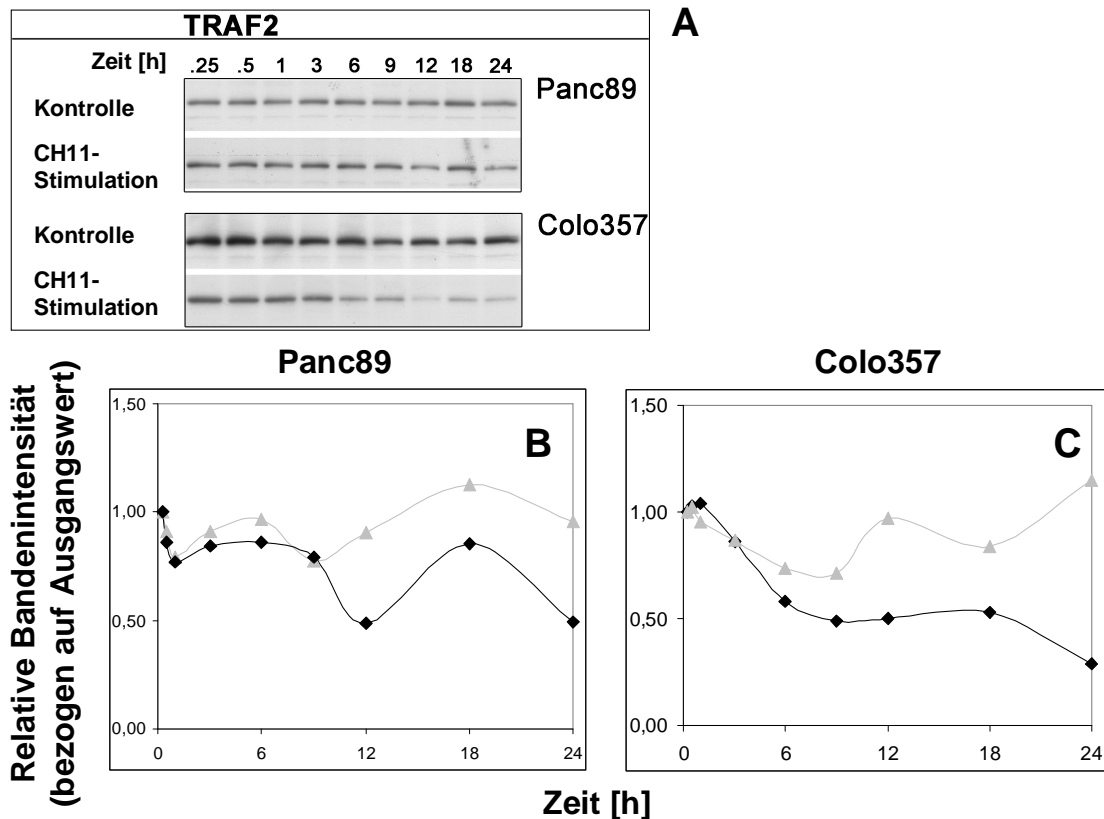
ähnlicher Konzentrationsverlauf in unstimulierten und stimulierten Zellen. Bis ca. 12 h bleibt in den unstimulierten Zellen das Konzentrationsniveau konstant und fällt dann ab. Der Konzentrationsabfall in der Endphase des Beobachtungszeitraums liegt bei ungefähr 20 %.

Bei Colo357 zeigt sich in den unstimulierten und CH11-stimulierten Zellen bis 9 h ein ähnlicher Verlauf mit einem Anstieg der cIAP1-Konzentration um ca. 25 %. In unstimulierten wie auch in stimulierten Zellen kommt es im Verlauf wieder zu einer Konzentrationsabnahme. Die höhere Konzentration wird allerdings in den CH11-stimulierten Zellen bis mindestens 18 h nach CH11-Stimulation gehalten. Bei 24 h wird dann ungefähr die Ausgangskonzentration erreicht. Dieser Konzentrationsverlauf unterscheidet sich damit deutlich von den anderen Inhibitor-of-Apoptosis-Proteine (IAP's) (vgl. Abb. 3.12, C und Abb. 3.13, C).

#### **3.2.4 TRAF2 und RIP**

Die Proteine Traf2 und RIP spielen, wie in der Einleitung erörtert (vgl. 1.4), ebenfalls eine Rolle in der CD95-vermittelten Apoptose als Vermittler-Proteine für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Erk und damit im weiteren Sinne für die NF- $\kappa$ B-vermittelte Apoptose-Inhibition durch Hochregulation von Inhibitor-Proteinen wie z.B. cIAP1, cIAP2, XIAP und TRAF2.

### 3. Ergebnisse

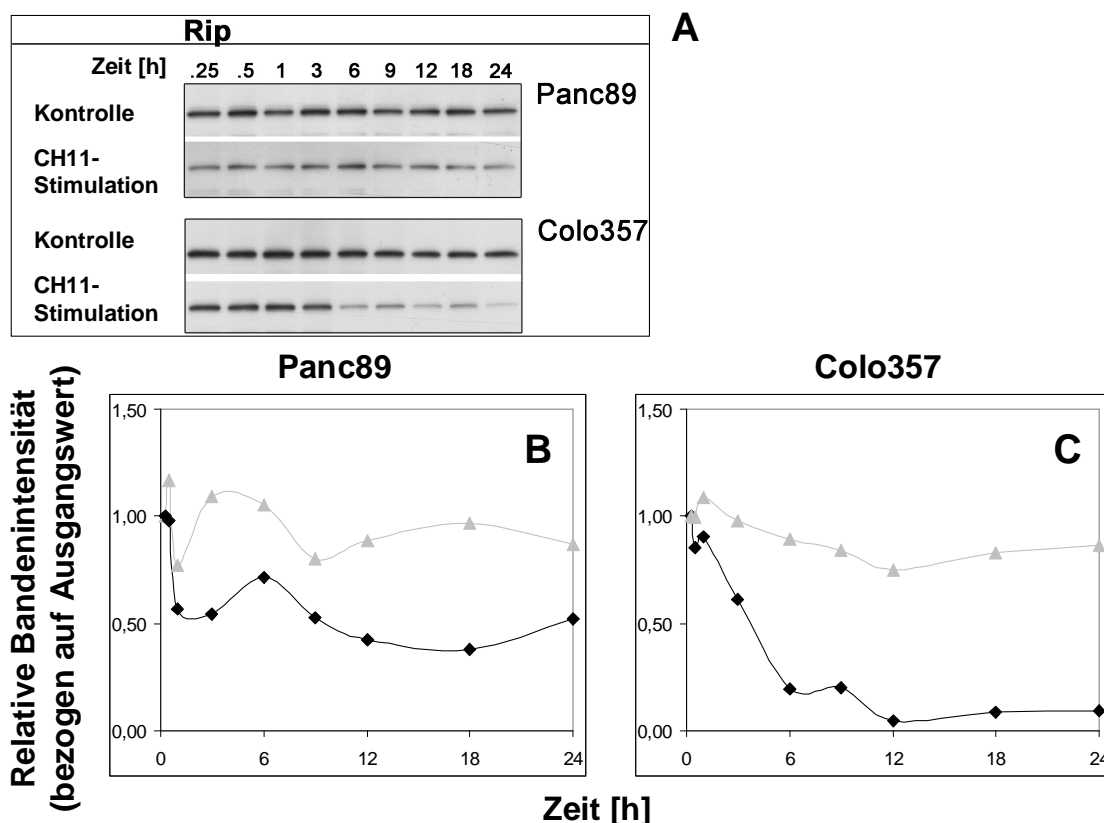


**Abb. 3.15: Zeitlicher Verlauf der Expression von TRAF2 ohne und nach Stimulation mit CH11** **A:** Abbildung der gescannten Westernblots. Darstellung der Banden von TRAF2 (52 kDa) mittels ECL. **B und C:** Auswertung als Diagramm (▲ Kontrolle, ◆ CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangswert, 15 min entsprechend 1,0). Bei Panc89 zeigen sich deutliche Schwankungen. Ab 9 h zeigt sich in den CH11-stimulierten Zellen ein Konzentrationsabfall, wohingegen in den Kontroll-Zellen ein gleichbleibende bis leicht zunehmende Konzentrationen zu verzeichnen ist. Bei Colo357 zeigt sich eine in den Zellen der unstimulierten Kontrolle initial ein deutlicher Konzentrationsabfall. Im Verlauf kommt es dann zu einem Wiederanstieg der Konzentration, der nach CH11-Stimulation ausbleibt.

Die Konzentration von TRAF2 in unstimulierten Zellen der Zelllinie Panc89 zeigen über die gemessenen 24 h kaum Veränderungen (vgl. Abb. 3.15B). Nach CH11-Stimulation zeigen sich ab 12 h teilweise niedrigere relative Bandenintensitäten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, der errechnete Konzentrationsabfall beträgt maximal ca. 20 %.

Deutlichere Veränderungen der TRAF2-Konzentrationen lassen sich hingegen bei Colo357 verzeichnen. Bereits nach Mediumwechsel kommt es zu einem Konzentrationsabfall maximal ca. 30% mit einem Tiefpunkt bis ca. 9 h (vgl. Abb. 3.15C). Nachfolgend kommt es zu einem etwas langsameren Wiederanstieg, wobei

wieder die Ausgangskonzentration erreicht wird. Nach CH11-Stimulation ist der Konzentrationsabfall deutlicher. Insbesondere im Zeitraum zwischen 1 h und 9 h sinkt die Konzentration um ca. 50 - 60 %. Es kommt zu keinem Wiederanstieg, stattdessen sinkt die Konzentration weiter, so dass sich nach 24 h ca. 70 % weniger TRAF2 im Lysat befinden als zu Beginn (Abb. 3.15C).



**Abb. 3.16: Zeitlicher Verlauf der Expression von RIP ohne und nach Stimulation mit CH11** A: Abbildung der gescannten Westernblots. Darstellung der Banden von RIP (74 kDa) mittels ECL.B und C: Auswertung als Diagramm ( $\blacktriangle$  Kontrolle,  $\blacklozenge$  CH11-stimuliert, Bandenintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten bezogen auf Ausgangsintensität, 15 min entsprechend 1,0); Es zeigen sich bei Panc89 insbesondere in den ersten 3 h deutliche Dichteschwankungen. Nach CH11-Stimulation lässt sich ein stärkerer Konzentrationsabfall verzeichnen. Bei Colo357 kommt es nach CD95-Stimulation zu einem deutlichen Konzentrationsabfall.

Bei den unstimulierten Panc89-Zellen kommt es bei RIP zu Schwankungen der Bandendichte um einen Mittelwert der ungefähr der Ausgangskonzentration entspricht (vgl. Abb. 3.16). Nach CH11-Stimulation kommt es hingegen zu einem Konzentrationsabfall. Die Endkonzentration liegt bei ca. 50 %.

### 3. Ergebnisse

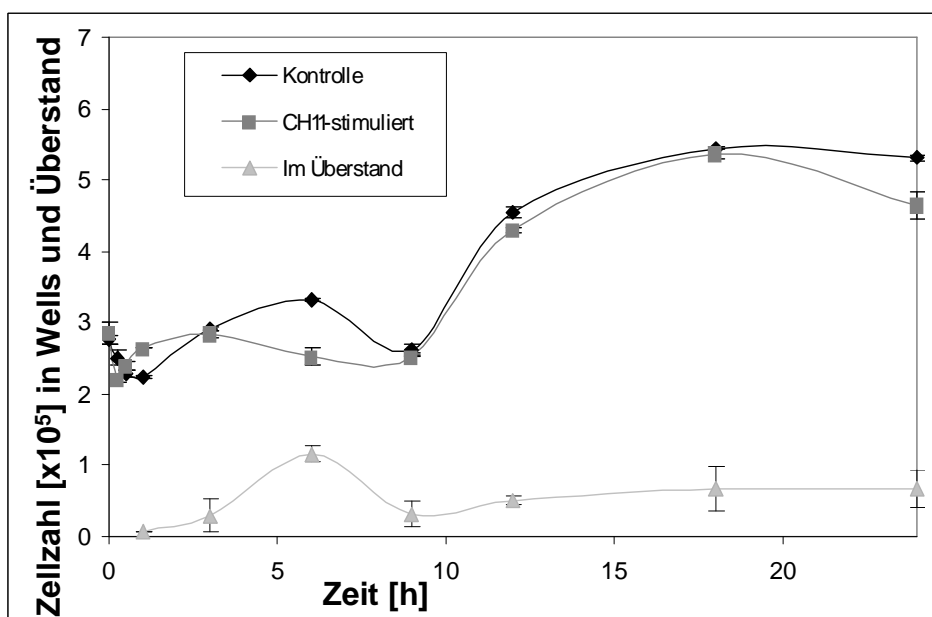
---

Die Konzentration von RIP ändert sich in den unstimulierten Colo357-Zellen nur geringfügig mit einem leichten zwischenzeitlichen Konzentrationsabfall um ca. 20 % bei 12 h. Im Rahmen der Apoptose nach CD95-Stimulation kommt es hingegen innerhalb der ersten 12 h zu einem deutlichen Konzentrationsabfall von ca. 85 %.

#### **3.3 Veränderung von Zellproliferation und Zelltod nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors**

Die Stimulation mittels des agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11 führt zu einer Aktivierung apoptotischer und nicht-apoptotischer Prozesse und beeinflusst damit auch das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen. Zudem führt auch ein Mediumwechsel zu Veränderungen der Zellproliferation. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien liegen Proliferationsdaten über mehrere Tage vor [33, 36]. Die Verdopplungszeit dieser mäßig differenzierten Zelllinien wird mit ca. 25 h angegeben. Dabei erfolgte die Proliferationsanalyse über mehrere Tage in 24 h- bzw. 3-Tages-Schritten, um das exponentielle Zellwachstum zu erfassen [33, 36]. Im Rahmen dieser Arbeit soll, parallel zu den Proteinanalysen, der direkte Einfluss von Mediumwechsel und CH11-Stimulation auf die Zellproliferation über die ersten 24 h untersucht werden. Für diese Proteinanalysen sind hohe Zellzahlen notwendig, so dass bereits am Ende des Untersuchungszeitraums ein konfluenter Zellrasen vorliegt. Daher bricht die Phase der exponentiellen Proliferation im Laufe des Beobachtungszeitraums von 24 h ab, die Zellzahlen erreichen ab ca. 18 h ein Plateau. Die ermittelten Verdopplungszeiten der untersuchten Zelllinien Colo357 und Panc89 liegen unter den genannten experimentellen Bedingungen bei 16 h und 18 h und sind damit kürzer als die vorbeschriebenen Verdopplungszeiten.



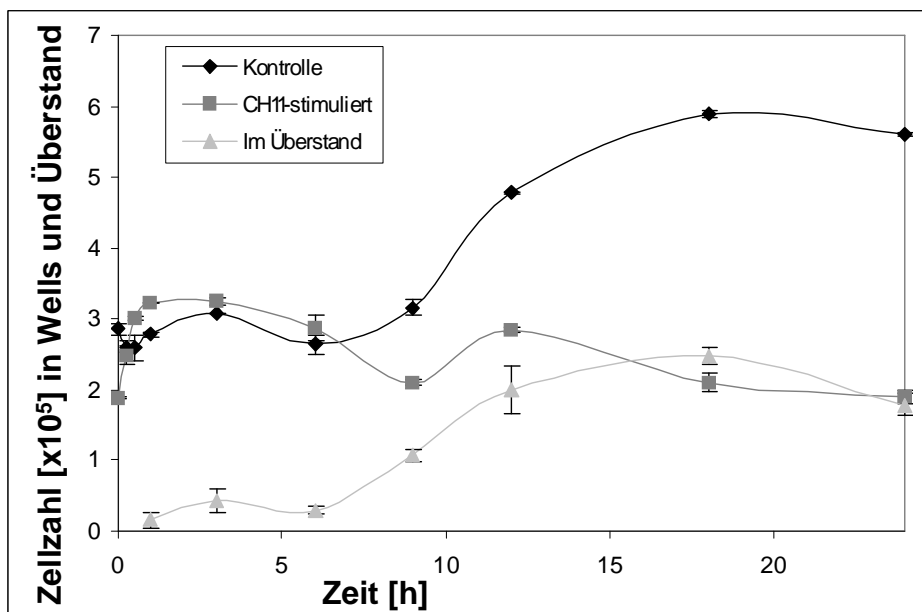


**Abb. 3.17: Die Zellproliferation bei Panc89 ohne und nach Stimulation mit CH11.** Dargestellt sind die Zellzahlen der unstimulierten Kontroll-Zellen sowie der CH11-stimulierten Zellen über den Untersuchungszeitraum von 24 h. Neben der Anzahl der adhären Zellen ist, als Hinweis auf apoptotische Prozesse, die Anzahl der nicht mehr adhären Zellen im Medium-Überstand der stimulierten Zellen angegeben. Abgebildet ist zudem die Standardabweichung aus einer Vierfach-Bestimmung der jeweiligen Zellzahlen eines Experiments (Intraassay-Standardabweichung). CH11-Stimulation zeigt keinen wesentlichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Panc89, die Anzahl der Zellen im Überstand nimmt im Untersuchungszeitraum auf ca. 64.000/Well zu.

Die Ermittlung der Zellproliferation erfolgte für Panc89 und Colo357 jeweils in zwei unabhängigen Experimenten, die aber aufgrund ihrer Komplexität nicht einer Gauss'schen Verteilung unterliegen. Daher ist in Abbildung 3.17 exemplarisch ein Experiment aufgeführt. Die Anzahl der Zellen entwickelt sich bei den Zellen der Zelllinie Panc89 nach Stimulation des CD95-Rezeptors ähnlich denen ohne Stimulation (vgl. Abb. 3.17). Über ca. 9 h kommt es zu keiner wesentlichen Proliferation, die Zellzahlen bleiben gleich. Im weiteren Verlauf kommt es aber zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahlen mit einem Plateau ab 18 h. In diesem Zeitraum verdoppeln sich die Zellzahlen. Die CH11-stimulierten Zellen erreichen über 24 h Zellzahlen von 93 % gemessen gegenüber der unstimulierten Kontrolle. CH11-Stimulation hat somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellteilung. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ohne Einbeziehung der Plateauphase ca. 18 h.

### 3. Ergebnisse

Pankreasadenokarzinom-Zellen sind in Kultur adhärenente Epithelzellen. Im Rahmen z.B. von Mitose, aber auch im Rahmen apoptotischer Prozesse verlieren die Zellen ihre Adhärenz. Daher erfolgte bei der Ermittlung der Zellproliferation als indirekter Hinweis auf Apoptose auch eine Bestimmung der Zellzahlen im Überstand. Die Zellzahl im Überstand steigt dabei über den Untersuchungszeitraum von 24 h in oben abgebildetem Experiment von ca. 7.000/Well auf 64.000/Well an.



**Abb. 3.18: Die Zellproliferation bei Colo357 ohne und nach Stimulation mit CH11.** Dargestellt sind die Zellzahlen der unstimulierten Kontroll-Zellen sowie der CH11-stimulierten Zellen über den Untersuchungszeitraum von 24 h. Neben der Anzahl der adhärenenten Zellen ist, als Hinweis auf apoptotische Prozesse, die Anzahl der nicht mehr adhärenenten Zellen im Medium-Überstand der stimulierten Zellen angegeben. Abgebildet ist zudem die Standardabweichung aus einer Vierfach-Bestimmung der jeweiligen Zellzahlen eines Experiments (Intraassay-Standardabweichung). Während in der unstimulierten Kontrolle von Colo357 wie bei Panc89 eine deutliche Zellproliferation ab 9 h einsetzt, nimmt die Zellzahl von Colo357 nach CH11-Stimulation ab 6 h ab. Gleichzeitig kommt es zu einem starken Anstieg der Zellzahlen im Überstand bis ca. 200.000/Well

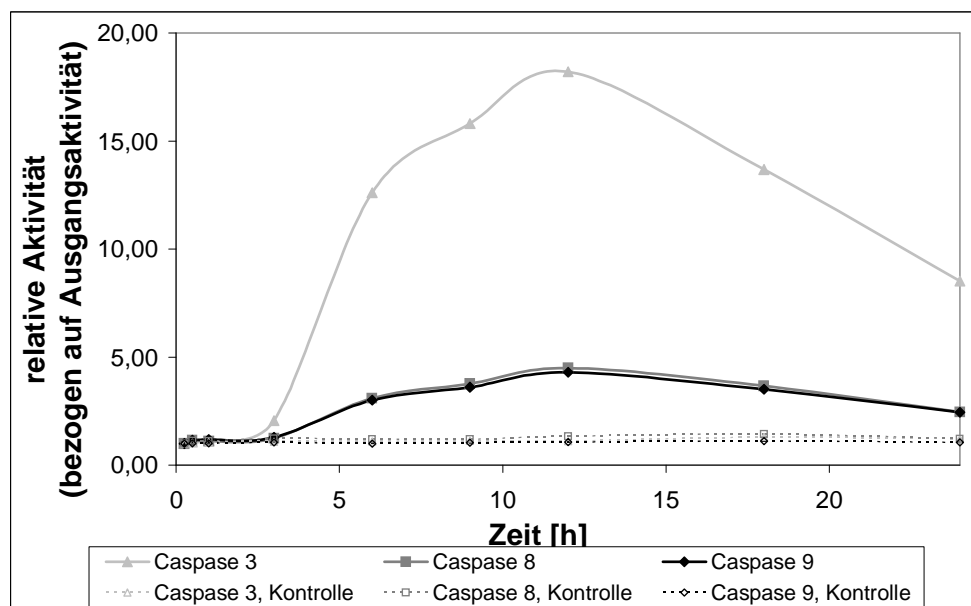
Auch Abbildung 3.18 zeigt exemplarisch eins von zwei unabhängigen Experimenten. Die unstimulierten Zellen zeigen bei Colo357 wie schon bei Panc89 gezeigt keine wesentliche Proliferation innerhalb der ersten 9 h nach Mediumwechsel. In diesem Zeitraum bleibt die Zellzahl gleich (vgl. Abb. 3.18). Ab 9 h nimmt dann die Zellzahl deutlich zu und erreicht wie bei Panc89 ab ca. 18 h ein Plateau. Die interpolierte Verdopplungszeit ohne das beobachtete Plateau liegt bei 16 h.

Nach CH11-Stimulation zeigt sich hingegen ab 6 h eine abnehmende Zellzahl. Die relative Zellzahl nach 24 h, bezogen auf die unstimulierte Kontrolle, beträgt nur 35 %. Dies zeigt indirekt die apoptotischen Prozesse, die Proliferation hemmen oder überwiegen. Passend zu apoptotischen Prozessen steigt auch die Zellzahl im Überstand nach CH11-Stimulation deutlich an. Die Zahl nimmt von 16.000/Well auf 200.000/Well zu.

### 3.4 Bestimmung der Caspase-Aktivität

Neben der Bestimmung der Konzentrationsveränderung der Pro-Caspasen-8 und -3 als indirektem Zeichen einer Caspase-Aktivierung erfolgt auch eine Bestimmung der Aktivität. Dadurch ist es möglich, zwischen Spaltung und damit Aktivierung der Pro-Caspasen und Expressionsveränderungen auf Proteinebene zu unterscheiden.

Analysiert wird die Aktivität der Caspasen -3, -8 und -9 in den Zellen Colo357 und Panc89 im Laufe der ersten 24 h nach Mediumwechsel bzw. CH11-stimulation durch Extinktionsmessung freigesetzter Fluorochrome (vgl. 2.2.6). In allen Zellen kann eine gewisse konstitutive Ausgangsaktivität der Caspasen festgestellt werden.

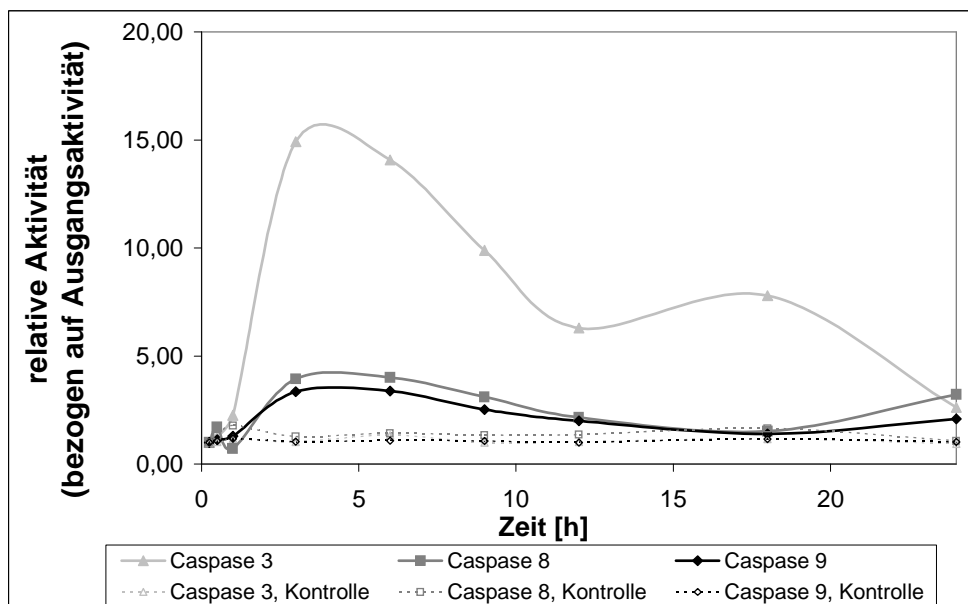


**Abb. 3.19: Caspaseaktivität in Panc89 ohne und nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors:** Auf der X-Achse ist die Zeit von Stimulationsbeginn an aufgetragen und auf der Y-Achse die relative Aktivität, wobei als Bezugspunkt die Aktivität kurz vor Stimulation als 1 gesetzt wurde. Die genauen Werte sind im Tabellarischen Anhang ersichtlich.

### 3. Ergebnisse

In den durch CH11 stimulierten Zellen der Zelllinie Panc89 zeigt sich eine deutliche Steigerung der Caspaseaktivität (vgl. Abb. 3.19). Der Anstieg ist bis 3 h nur gering auf Werte von ca. 200 % der Ausgangsaktivität und hat seine stärkste Steigung von 3h auf 6h. Dabei erreicht die Caspase-3 bei 12 h ein Aktivitätsniveau von über 1800 % der Ausgangsaktivität, Caspase-8 und Caspase-9 haben zum selben Zeitpunkt eine relative Aktivität von ca. 400-450 %. Nach diesem Maximum fällt die Aktivität aller Caspasen ab, ist aber auch am Ende der Beobachtungen bei 24 h noch deutlich über dem Ausgangsniveau. Insbesondere der deutliche Anstieg der Aktivität von Caspase-3 ist als maßgeblich für die Apoptose in den untersuchten Zellen zu sehen, da die Caspase-3 in Typ-II-Zellen als primäre Effektor-Caspase für endgültige Amplifikation des apoptotischen Signals (durch weitere Spaltung der Pro-Caspase-8) verantwortlich ist (vgl. 1.3.2).

Verglichen mit den Aktivitätssteigerungen der untersuchten Caspasen sind die Aktivitätsveränderungen nach alleinigem Mediumwechsel gering und erreichen maximal 150 % der Ausgangsaktivität bei einer insgesamt deutlich langsameren Dynamik.



**Abb. 3.20: Caspaseaktivität in Colo357 ohne und nach Stimulation des CD9-Todesrezeptors:** Auf der X-Achse ist die Zeit von Stimulationsbeginn an aufgetragen und auf der Y-Achse die relative Aktivität, wobei als Bezugspunkt die Aktivität kurz vor Stimulation als 1 gesetzt wurde. Die genauen Werte sind im Tabellarischen Anhang ersichtlich.

Bei der Zelllinie Colo357 verändert sich in der ersten Stunde nach Stimulation das Aktivitätsniveau nur geringfügig, wobei die Aktivität der Caspase-3 sich auf ca. das doppelte der Ausgangsaktivität steigert (vgl. Abb. 3.20). Die stärkste Aktivität der Caspasen wird bei 3 h gemessen, was einen deutlichen Unterschied zum Verlauf bei Panc89 darstellt. Dort wird erst nach 12 h nach CH11-Stimulation die stärkste Aktivität der Caspasen gemessen. Die maximalen Aktivitätssteigerungen sind dabei in den beiden Zelllinien ähnlich. Sie liegen bei Colo357 für die Caspase-3 bei 1500 % und für die Caspase-8 und Caspase-9 bei ca. 400 % bzw. ca. 350 % der Ausgangsaktivität. Nach der maximalen Aktivität bei 3 h fällt diese ab. Bei Caspase-3 hält dieser Aktivitätsabfall bis 12 h an, bei den anderen beiden Caspasen bis 18 h. Im durchgeführten Versuch steigt das Aktivitätsniveau der Caspasen dann nochmals an. Die Caspase-3 erreicht dabei nochmals ca. 800 % der Ausgangsaktivität bei 18 h. Danach fällt das Aktivitätsniveau der Caspase-3 erneut auf Werte um 260 % ab.

Auch bei Colo357 zeigen die Zellen der unstimulierten Kontrolle keine wesentliche Aktivitätszunahme.

### **4 Diskussion**

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit Apoptoseresistenz bzw. -suszeptibilität nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors bei Pankreaskarzinomzellen mit quantitativ zu erfassender Expression verschiedener apoptoserelevanter Proteine korreliert werden kann. Insbesondere die Veränderung der Proteinexpression innerhalb der ersten 24 Stunden nach Behandlung mit einem agonistischen anti-CD95-Antikörper im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen soll dabei Aufschlüsse geben über Abläufe von apoptotischen und nichtapoptotischen Signalketten in unterschiedlich apoptoseresistenten Zellen.

Als Modellsysteme kommen dabei die Zelllinien Panc89 und Colo357 zum Einsatz, von denen bereits früher gezeigt wurde, dass erstere weitgehend resistent und zweitens sensitiver gegenüber CD95-induzierter Apoptose ist [37].

Die Vermutung ist dabei, dass Apoptoseresistenz nicht nur durch die Ausgangskonzentrationen resistenzvermittelnder Proteine vermittelt wird, sondern auch die Dynamik von Konzentrationsvorgängen zu unterschiedlichen adaptiven Vorgängen in den Zellen führen und damit die Apoptoseresistenz zusätzlich beeinflussen.

Außerdem sollten in dieser Arbeit erste Daten gesammelt werden für ein sich anschließendes unabhängiges Projekt, das die Etablierung eines mathematischen Modells zur Simulation apoptotischer Prozesse in einem Computerprogramm zur Zielsetzung hat.

#### **4.1.1 Unterschiedliche Dynamik der Caspase-Kaskade in den untersuchten Zelllinien**

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien Panc89 und Colo357 sind Vertreter von Typ-II-Zellen [5, 38]. Dies zeigt sich insbesondere in den Ergebnissen, die die Signalkaskade der Caspasen und Bid betreffen. Anhand des Konzentrations- und Aktivitätsverlaufs dieser Proteine lässt sich auch die Apoptosesuszeptibilität von

Colo357 im Vergleich zu Panc89 als apoptose-resistenterer Zelllinie demonstrieren, da diese Proteine im Rahmen der Apoptose gespalten werden und dadurch (im Falle der Caspasen) enzymatische Aktivität gewinnen. Diese Spaltung und Aktivität lassen sich gut mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methoden nachweisen. Die Westernblot-Analysen zeigen in den CH11-stimulierten Colo357-Zellen für Pro-Caspase-3 einen starken Abfall der Konzentration ab 1h (vgl. Abb. 3.9C). Dies wurde unabhängig in auch anderen Experimenten der Arbeitsgruppe gezeigt [39, 40] und deckt sich zeitlich mit der in Caspase-Assays gemessenen Aktivitätssteigerung der Caspase-3 (vgl. Abb. 3.20). Die beobachtete Konzentrationsabnahme von Pro-Caspase-3 und die gleichzeitig einsetzende starke Aktivitätszunahme von Caspase-3 spiegelt die Abhängigkeit apoptotischer Prozesse in Typ-II-Zellen von der Caspase-3-Aktivität gut wider. In den Westernblots zeigt sich zur gleichen Zeit auch ein Abfall der Konzentrationen von Bid und Pro-Caspase-8 (vgl. Abb. 3.7C und 3.8C). Damit übereinstimmend liegt im selben Zeitraum das durch Caspase-Assays gemessene Aktivitätsmaximum der Caspase-8 (vgl. Abb. 3.20). Diese sehr gute und wiederholbare Übereinstimmung aller die Caspase-Kaskade betreffenden Daten mit den Erwartungen einer zu diesem Zeitpunkt einsetzenden Apoptose kann auch als Erfolgskontrolle der Untersuchung an sich herangezogen werden.

Das unterschiedliche Apoptoseverhalten zwischen Colo357 und Panc89 zeigt sich deutlich in der Konzentrationsabnahme der Proteine Pro-Caspase-8, Pro-Caspase-3 und Bid über den Untersuchungszeitraum. Während es bei Colo357 zu einer starken Abnahme der Proteinkonzentration bis an die Nachweisgrenze kommt, zeigt sich bei Panc89 ein kaum nachweisbarer Konzentrationsunterschied im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle für Pro-Caspase-8 und Bid (vgl. Abb. 3.7B und 3.8B). Erst bei der Effektor-Caspase Pro-Caspase-3 lässt sich in Panc89 ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und den stimulierten Zellen nachweisen (vgl. Abb. 3.9B). Dieses Protein wird erst nach Signalamplifikation durch das Mitochondrium im weiteren Verlauf der Caspase-Kaskade gespalten.

Die Aktivitätszunahme der Caspase-3 ist in beiden Zelllinien dramatisch größer als die der Caspase-8 und der Caspase-9. Zudem wird in beiden untersuchten Zelllinien im Vergleich zu Pro-Caspase-8 und Bid ein höherer Anteil der Präkursor-Proteine

#### 4. Diskussion

---

gespalten (vgl. Abb. 3.7 - Abb. 3.9). Bemerkenswert ist dabei, dass sich die Aktivitätszunahme der Caspase-9 trotz des auf mitochondrialer Ebene einsetzenden Verstärkungsmechanismus apoptotischer Signale ähnlich verhält wie die Aktivitätszunahme der Caspase-8. Erklären lässt sich dies über die unterschiedliche Zymogenität (Faktor der Spaltungsaktivität des aktivierten Produkts im Verhältnis zur Spaltungsaktivität der Pro-Form) der Caspasen. So steigert sich die Aktivität bei Caspase-9 im Verhältnis zu Pro-Caspase-9 nur um ca. den Faktor 10, bei Caspase-8 ist es im Verhältnis zu Pro-Caspase-8 der Faktor 100. Im Gegensatz dazu hat Caspase-3 10.000mal höhere Aktivität als Pro-Caspase-3 [15]. Somit ist bereits das Erreichen der gleichen Aktivität wie Caspase-8 für Caspase-9 ein Zeichen der Signalverstärkung, da ca. 10fach mehr Caspase-9 aktiviert wird als Caspase-8. Trotz der deutlichen Unterschiede im Apoptoseverhalten der beiden untersuchten Zelllinien sind die maximalen relativen Aktivitätswerte der Caspasen vergleichbar (vgl. Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Der Konzentrationsabfall der Pro-Caspase-3 und der Aktivitätsanstieg der Caspase-3 ist in beiden Zelllinien nach CD95-Stimulation mittels CH11 deutlich ausgeprägt, insbesondere die maximale Aktivität der Caspase-3 erreicht in beiden Zelllinien ungefähr gleiche relative Werte im Vergleich zur jeweiligen Ausgangsaktivität. Dieses Ergebnis verdeutlicht nochmals die wichtige Bedeutung der Caspase-3 für die Apoptose in Typ-II-Zellen, erklärt hingegen für sich genommen nur partiell (durch den Umstand der geringeren Konzentrationsabnahme in Panc89 im Vergleich zu Colo357) die relative Apoptose-Resistenz von Panc89 gegenüber Colo357. Allerdings ist die Ausgangskonzentration von Pro-Caspase-3 in Panc89-Zellen geringer [37]. Somit ist die Konzentration an aktivierter Caspase-3 nach CH11-Stimulation in Panc89-Zellen ebenfalls geringer. Zudem ist Apoptose für die einzelne Zelle immer ein absoluter Prozess der Kommitierung. Das heißt in diesem Zusammenhang möglicherweise, dass zwar weniger Panc89-Zellen in die Apoptose eintreten als Colo357-Zellen, der absolute Konzentrationsabfall in diesen apoptotischen Zellen aber aufgrund der höheren Ausgangskonzentration von Pro-Caspase-3 eine vergleichbare relativen Aktivitätszunahme bewirkt. Somit steht diese vergleichbare maximale Aktivität nicht im Widerspruch zum nachgewiesenen Apoptoseverhalten der untersuchten Zelllinien.



Ein wichtiger, charakteristischer Unterschied zwischen den beiden Zelllinien Colo357 und Panc89, der die unterschiedliche Apoptose-Resistenz gut erklären kann, liegt in der Dynamik der Caspaseaktivität. Die Aktivität der Caspasen, insbesondere der Caspase-3, nimmt bei Colo357 nach der initialen, für Typ-II-Zellen typischen, Verzögerung steil zu (vgl. Abb. 3.20). Bei Panc89 hingegen wird die Aktivierung auf 3 h verzögert und erreicht ihr Maximum erst bei 12 h (vgl. Abb. 3.19). Eine mögliche Erklärung für diese deutlichere Verzögerung der Aktivierungs-Kaskade der Caspasen bieten Bentele et. al. [32]: Die Initiierung der Caspase-Kaskade ist abhängig von der Aktivierung von Caspase-8 am DISC. Erst ab einer kritischen Menge an aktivierter Caspase-8 wird eine sich selbst im Sinne eines Feedback-Mechanismus erhaltende Signalkaskade eingeleitet (Caspase-8 -> Caspase-3 -> Caspase-6 -> Caspase-8), wobei wie erwähnt die wichtigste Amplifikation in dieser sich verstärkenden Kaskade über die Caspase-3 abläuft. Dies deckt sich auch mit der Dynamik der Spaltung, die mittels Westernblots nachgewiesen wurde. Dabei fallen die Konzentrationen von Bid und Pro-Caspase-3 in Colo357 bereits bis 6 h steil ab, wohingegen die Konzentration von Pro-Caspase-8 als abhängiger Caspase in Typ-II-Zellen einen dazu verzögerten Abfall aufweist (vgl. Abb. 3.7 – 3.9). Eine weitere mögliche Erklärung für die verzögerte Caspase-Aktivierung in Panc89 im Vergleich zu Colo357 kann die in diesen Zellen niedrigere FADD-Konzentration sein [37]. Die Korrelation der FADD-Konzentration mit der Resistenz gegenüber rezeptorvermittelter Apoptose konnte für Pankreasadenokarzinome bereits gezeigt werden [37, 40]. Niedrigere FADD-Konzentrationen führen zu einer weniger effektiven DISC-Bildung und damit letztlich zu einer verminderten Aktivierung von Caspase-8, welches auch in Typ-II-Zellen als Initiator-Caspase notwendig ist. In klinischen Beobachtungen sind Adenokarzinome mit einer niedrigeren Konzentration von FADD größer und bei Entdeckung oft metastasiert [41]. Die nachgewiesene Konzentrationsabnahme von FADD in den Zelllinien Panc89 und Colo357 (vgl. Abb. 3.11), konnte bereits für andere Zellen nach CD95-Aktivierung nachgewiesen werden [42]. Der Konzentrationsabfall ist dabei wahrscheinlich über Degradationsprozesse nach Aktivierung und Internalisierung des CD95-Rezeptors zu erklären. Allerdings zeigen sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen keine relevanten Unterschiede im Konzentrationsverlauf zwischen unstimulierten und CH11-stimulierten Zellen.

## 4. Diskussion

---

Die Expression von Pro-Caspase-8 ist in Panc89-Zellen geringer als in Colo357-Zellen [37]. Die Expressionsunterschiede von FADD und Pro-Caspase-8 bedingen eine verminderte Caspase-8-Aktivierung am DISC. Diese Beobachtungen passen zu der ebenfalls postulierten Rolle von TRAF2 als resistenzvermittelndes Protein [43]. In diesem Zusammenhang wurde die durch TRAF2 vermittelte Apoptoseresistenz auf Stufe der Caspase-8-Aktivierung nachgewiesen. Durch die durch diese verschiedenen Faktoren (niedrige FADD- und Pro-Caspase-8-Konzentrationen, erhöhte Aktivität von TRAF2) bedingte Verzögerung der Einleitung der Caspase-Kaskade wird möglicherweise ein zeitlicher Spielraum für die Induktion weiterer apoptoseresistenz-vermittelnder Proteine geschaffen. Dadurch könnte die Apoptose weitgehend blockiert werden (vgl. [32, 43]). Induktion apoptoseresistenz-vermittelnder Proteine wird dabei unter anderem durch nichtapoptotische Signalwege vermittelt.

### **4.1.2 Dynamische Proteinkonzentrationsänderungen im Rahmen nichtapoptotischer Signalkaskade**

Eine der wichtigsten nicht-apoptotischen Signalkaskaden nach CD95-Stimulation ist der NF- $\kappa$ B-Signalweg (vgl. 1.4, [24, 44]). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist dabei auf DISC-Ebene unter anderem abhängig von FADD und Caspase-8 [25]. Wichtige Adapterproteine für diesen Signalweg am DISC sind RIP [25, 45] und TRAF2 [43]. RIP aktiviert nach Stimulation von Todesrezeptoren die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade. Kommt es hingegen zu apoptotischen Prozessen, so wird RIP im Zuge dieser Prozesse gespalten. Caspase-abhängige Spaltung von RIP ist ein allgemeiner Prozess der rezeptorvermittelten Apoptose und geht mit einer Deaktivierung der nichtapoptotischen Signalfunktion einher [25, 46]. In beiden untersuchten Zelllinien ist nach CH11-Stimulation ein Abfall der RIP-Konzentration nachweisbar, der zeitlich mit dem Konzentrationsabfall der Caspasen einsetzt (vgl. Abb. 3.16B und C). Der Abfall der RIP-Konzentration ist deutlicher bei Colo357 ausgeprägt, was mit den Befunden dieser Arbeit und anderer Studien korreliert, dass bei der Zelllinie Colo357 im Vergleich zu Panc89 mehr Zellen in die Apoptose eintreten. Zudem ist für die Spaltprodukte von RIP auch eine proapoptotische Wirkung durch NF- $\kappa$ B-Inhibition

bekannt [25, 46, 47], was ebenfalls mit der höheren Apoptose-Suszeptibilität von Colo357 korreliert.

Für Colo357 konnte allerdings auch nachgewiesen werden, dass bei Caspase-Inhibition (mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk) zwar die RIP-Spaltung und somit die Freisetzung pro-apoptischer Spaltprodukte vermindert wird, es aber dadurch zu einer verminderten NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt [40]. Zudem lässt sich trotz RIP-Spaltung in CH11-stimulierten Colo357-Zellen eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachweisen [40]. Dafür spricht auch der Konzentrationsverlauf von cIAP-1 in den ersten 9 h bei Colo357, welches durch NF- $\kappa$ B induziert wird [27]. Im Gegensatz zu den anderen IAP's steigt die Konzentration im Verlauf auch bei CH11-stimulierten Colo357-Zellen an (vgl. Abb. 3.14C), trotz der anzunehmenden Spaltung von cIAP-1 durch Caspasen [14]. Dies deutet auf eine zusätzliche Caspase-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Colo357-Zellen hin. In dominant negativen RIP-Deletionsmutanten zeigt sich eine unterdrückte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die bei Überexpression von FLIP umgangen werden kann [48]. Dazu passend kann RIP-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung (in T-Zellen) nicht durch Caspase-Inhibition unterbunden werden, im Gegensatz zu FLIP-abhängiger NF- $\kappa$ B-Aktivierung [26]. Im Vergleich zu anderen Pankreasadenokarzinom-Zellen ist zudem die konstitutive Expression von FLIP in Colo357-Zellen deutlich erhöht und entspricht dem Gehalt in hochresistenten Zellen der Zelllinie PancTu1 (vgl. tabellarischer Anhang). Diese Befunde implizieren zusammengenommen für Colo357 eine hauptsächlich über FLIP<sub>L</sub> und TRAF2 vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, was sich auch mit anderen Arbeiten deckt [40]. Bei dieser Form der NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird der Signalweg über das Adaptermolekül TRAF2 durch ein FLIP/Caspase-8-Dimer beziehungsweise gespaltenes FLIP initiiert [26, 28]. Im Gegensatz dazu ist der Gehalt an FLIP bei Panc89-Zellen deutlich geringer [37]. Zudem führt in Panc89- eine Caspase-Inhibition zu einer vermehrten NF- $\kappa$ B-Aktivierung [40]. Dies stützt die These einer RIP-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie eines pro-apoptischen, durch Caspase erzeugten RIP-Spaltproduktes in Panc89. Im Gegensatz zu Colo357 wird somit in Panc89 über RIP-Spaltung ein deutlicher Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade genommen.

#### 4. Diskussion

---

Allerdings unterscheidet sich die konstitutive Expression von TRAF2 in den beiden untersuchten Zelllinien deutlich (vgl. tabellarischer Anhang, [43]), so dass anzunehmen ist, dass die hohe Ausgangskonzentration von TRAF2 in Panc89 einen wesentlichen Teil zu der Apoptoseresistenz dieser Zelllinie beiträgt. Sowohl in unstimulierten als auch in CH11-stimulierten Colo357-Zellen kommt es zusätzlich zu den niedrigeren Ausgangskonzentrationen zu einem Konzentrationsabfall von TRAF2 (vgl. Abb. 3.15C). Degradation von TRAF2 im Rahmen von rezeptorvermittelter Apoptose ist für die Aktivierung des TNF-RII-Rezeptors bereits beschrieben [49] und ein pro-apoptotischer Vorgang, da dadurch der klassischen Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den oben genannten Signalkomplex entgegen gewirkt wird. Allerdings findet die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bereits in der ersten Stunde nach CH11-Stimulation statt, wohingegen die Spaltung von TRAF2 erst später einsetzt [40]. Zusätzlich kann es aber auch durch TRAF2-Spaltung zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommen [24].

Insgesamt lässt sich bezüglich der Aktivierungsprozesse von NF- $\kappa$ B über RIP und TRAF2 festhalten, dass diese Proteine, aufgrund ihrer konstitutiven Expression bzw. aufgrund anderer diese Signalkaskade betreffender Proteine wie z.B. FLIP (vgl. 1.4), in den untersuchten Zelllinien Colo357 und Panc89 unterschiedliche Bedeutung haben. So könnte bei Panc89 insbesondere die hohe Ausgangskonzentration an TRAF2 zu Apoptoseresistenz führen, RIP hingegen wird nach CD95-Stimulation gespalten (vgl. Abb. 3.16B) und kann somit pro-apoptotische Signalprozesse verstärken [40]. In Colo357 wird RIP zwar auch nach CD95-Stimulation gespalten, eine Inhibition dieser Spaltung vermindert aber NF- $\kappa$ B-Aktivierung statt sie wie erwartet zu verstärken. Somit könnte in Colo357 vor allem TRAF2 nach CD95-Stimulation zu NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen [40].

Eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt in Colo357-Zellen zwar zu Induktion Apoptoseresistenz-vermittelnder Proteine (vgl. 1.4), diese werden aber im Rahmen apoptotischer Prozesse weitgehend aufgehoben. So zeigt sich bei einer anderen Studie nach Stimulation mit CH11 über 6 h eine verminderte oder gleichbleibende RNA-Konzentrationen Apoptoseresistenz-vermittelnder Proteine (cIAP-1, cIAP-2, XIAP, TRAF2) [40]. Die Konzentrationsverläufe von cIAP-2 und XIAP in Colo357 in dieser Arbeit sprechen zudem für Degradationsprozesse bei IAP's im Rahmen der Apoptose

(vgl. Abb. 3.12C und 3.13C.). Eine Spaltung von I $\kappa$ B als indirekter Hinweis auf NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist bereits nach 45 Minuten, und damit vor der Degradation dieser Proteine, nachweisbar [40]. Der in den Konzentrationsverläufen von cIAP-1 nachgewiesene Konzentrationsanstieg setzt im Vergleich zur Caspase-Aktivität verspätet ein (vgl. Abb. 3.14C sowie Abb. 3.20). Denkbar ist, dass es in den nicht durch CH11-Stimulation in die Apoptose eingetretenen Colo357-Zellen zu deutlichen Induktionsprozessen kommt, die, zumindest bei cIAP-1, die Degradation in den apoptotischen Zellen ausgleichen.

Insbesondere aufgrund des im Vergleich zu cIAP-2 und XIAP deutlich unterschiedlichen Konzentrationsverlaufs ergibt sich die Frage, inwieweit cIAP-1 in den untersuchten Zelllinien Apoptoseresistenz vermittelt. Induktion von Apoptoseresistenz-vermittelnden Proteinen wie cIAP-1 und XIAP im Rahmen der Apoptose bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde bereits für verschiedene Pankreasadenokarzinom-Zelllinien gezeigt [39]. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle von XIAP für die Apoptoseresistenz von PancTul bereits postuliert. Die Inhibition von Caspase-3 durch cIAP-1 hat deutlichen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit Plattenepithel- und Nierenzellkarzinomen [50, 51], auch wenn für XIAP eine im Vergleich zu cIAP-1 größere inhibitorische Potenz nachgewiesen wurde [23]. Für die Zelllinien Colo357 und Panc89 lässt sich ein Anstieg von cIAP1 in den CH11-stimulierten Zellen nachweisen. Diese Veränderung umfasst bei Colo357 vor allem den Zeitraum zwischen 3 h und 9 h und liegt damit in dem zeitlichen Bereich, in den auch der in den Caspase-Aktivitäts-Assays gemessene Aktivitätsabfall der Caspasen bei Colo357 fällt. Da die durch IAPs vermittelte Caspase-Inhibition vor allem bei niedriger Caspase-Aktivität der Apoptose entgegengesetzt wirkt [32] ist ein Schutz über cIAP-1 allerdings nur als relativ zu sehen, d.h. bei höheren Konzentrationen von Todesliganden reicht die Blockierung der Caspase-Aktivierung durch die IAP's nicht mehr aus und eine Apoptose wird eingeleitet.

Auch in Panc89-Zellen erreicht das Inhibitor-Protein cIAP-1 höhere Konzentrationen nach CH11-Stimulation, was generell auf eine wichtige Rolle insbesondere dieses Inhibitor-Proteins hinweist. In Panc89-Zellen wird zudem aufgrund einer verminderten FADD-Konzentration im Vergleich zu Colo357 am DISC weniger

#### 4. Diskussion

---

Caspase-8 aktiviert. Dies ist eine weitere Erklärung für die in dieser Zelllinie verzögerte Apoptose. In Panc89 kommt es erst zwischen 3 h und 6 h zu einer starken Aktivitätszunahme der Caspasen, das Maximum der Aktivität wird bei 12 h nach Stimulation mit CH11 erreicht. Das Aktivitätsmuster der Caspasen bis 12 h wird dabei nicht von starken Veränderungen der Inhibitor-Proteine flankiert. Für cIAP-2 zeigen sich dabei in den Konzentrationsverläufen kaum Unterschiede zwischen Kontrolle und CH11-stimulierten Zellen. Der Vergleich mit dem starken Abfall von cIAP-2 in Colo357 deutet aber darauf hin, dass dieses Protein in Panc89-Zellen über den Zeitraum der Stimulation ein höheres Maß an Resistenz vermitteln könnte als bei Colo357, passend auch zu der geringeren konstitutiven Expression dieses Proteins in Colo357 (vgl. Tabellarischer Anhang (semiquantitativ ausgewertet, Blots freundlichst überlassen von A. Trauzold), [52]). Beide untersuchten Zelllinien Colo357 und Panc89 zeigen für XIAP nach CH11-Stimulation einen deutlichen Konzentrationsabfall. Insbesondere bei Colo357 fällt die Konzentration vor allem in der Frühphase (ab ca. 1 h bis 12 h) nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors ab (vgl. Abb. 3.13C). Trotz der höheren inhibitorischen Potenz von XIAP im Vergleich zu anderen IAP's [23] sprechen diese Ergebnisse für eine eher untergeordnete Rolle von XIAP für die Apoptoresistenz bei Colo357. Bei Panc89 ist die Dynamik der Konzentrationsveränderung eine andere, mit einem Abfall ab 6 h. Inwieweit dies auf eine andere Bedeutung von XIAP als Apoptose-Regulator in Panc89-Zellen hinweist ist allerdings anhand der hier durchgeführten Versuche nicht nachzuweisen.

In Zusammenfassung der durchgeführten Versuche lassen sich abschließend folgende grundsätzliche Unterschiede in den beiden Zelllinien festhalten:

1. Deutlichstes Merkmal der Resistenzmechanismen in Panc89-Zellen ist die im Vergleich zu Colo357 verzögert einsetzende und insgesamt verminderte Apoptose
2. Der wichtige nicht-apoptotische Signalweg über NF- $\kappa$ B wird in den beiden Zelllinien offenbar über unterschiedliche Mechanismen aktiviert.

3. Nach CH11-Stimulation kommt es zu Veränderungen der Proteinexpression, die in den betroffenen Zellen der rezeptorvermittelten Apoptose entgegenwirken und somit Apoptoseresistenz erzeugen.

#### **4.2 Beurteilung semiquantitativer Daten bei Röntgenfilm-basiertem Westernblotting**

Die Veränderungen der Proteinexpression nach CH11-Stimulation werden vor allem durch Westernblot-Experimente mit Visualisierung durch Chemilumineszenz (ECL) bestimmt und durch Densitometrie gemessen.

Durch die Experimente des präanalytischen Komplexes können Qualitätsstandards (vgl. 3.1.1) und Umrechnungswerte für eine relative Quantifizierung (vgl. 3.1.2) definiert und validiert werden. Mithilfe dieser Standards ist eine Vergleichbarkeit von Banden innerhalb eines Blots bzw. eine Vergleichbarkeit verschiedener Blots untereinander (semi-)quantitativ möglich. Der präanalytische Komplex definiert diese Standards anhand idealer Blots im Sinne von Verdünnungsreihen mit definierten Proteinmengen.

##### **4.2.1 Beziehung zwischen Proteinmenge und Bandenintensität in dynamischen Systemen**

Im Rahmen der Verdünnungsreihen konnte eine lineare Beziehung zwischen Zunahme der Bandenintensität und der Konzentration der untersuchten Proteine über ca. eine log-Stufe gezeigt werden. Dies deckt sich mit anderen Arbeiten zur quantitativen Westernblot-Analyse. Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen (untersuchtes Protein bzw. primärer Antikörper) ist mit enzymatischen Reaktionen zu vergleichen, im Prinzip besteht damit zwischen Proteinmenge und Bandenintensität eine hyperbole Beziehung [53]. Für eine quantitative Untersuchung über ein weites Spektrum ist daher im Idealfall eine Verdünnungsreihe auf dem selben Blot mit durchzuführen, um eine entsprechende Regressionskurve zu erstellen. Der Vorteil einer auf dem Blot ebenfalls abgebildeten Verdünnungsreihe liegt neben dem weiteren Beurteilungsbereich bezüglich der Umrechnung von Bandenintensität in

#### 4. Diskussion

---

(relative) Konzentration im sicheren Ausschluss von Filmsättigung [53]. Über einen log-Bereich von 1 ist allerdings eine lineare Beziehung eine gute Näherung der tatsächlichen hyperbolen Regression [53, 54]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich sogar, unter Berücksichtigung der unter 3.1.1 festgelegten Qualitätsstandards, für die untersuchten Proteine eine adäquate Linearität zwischen Proteinkonzentration und Bandenintensität über bis zu 1,18 log-Stufen (vgl. Abb. 3.4). Dies zeigt die Wichtigkeit einer Standardisierung und Validierung der quantitativen Auswertung. In dieser Arbeit zeigte sich ist die Verwendung einer linearen Regression bei der Beurteilung von Konzentrationsveränderungen bis 90 % Konzentrationsabnahme als eine gute Alternative zur Erstellung einer hyperbolen Regressionskurve.

Die Standardabweichung der Bandenintensität bei der quantitativen Auswertung von Westernblots liegt unter Standardbedingungen bei Verwendung einer CCD-Kamera bei wiederholten Messungen eines Blots bei bis zu 10 - 20 % [53, 55]). In dynamischen Systemen ergibt sich damit die Problematik, trotz bekannter linearer Beziehung Änderungen der Bandenintensität in Konzentrationsveränderungen umzurechnen. Aufgrund der hohen Standardabweichung sind viele Wiederholungen notwendig, um den Konzentrationsverlauf sicher zu bestimmen. Eine Möglichkeit, fehlerhaft zu intensiv oder schwach abgebildete Banden aufgrund unterschiedlicher Belichtungsdynamik an verschiedenen Positionen eines Films zu vermeiden und damit die Standardabweichung zu reduzieren, liegt in der randomisierten Gelbeladung, bei der die Position der Lysate in den Wiederholungsexperimenten wechselt [55]. Eine weitere, allerdings qualitative, Möglichkeit bietet der Vergleich mit den anderen Banden des Blots [34]. Diese Methode diente in dieser Arbeit als Beladungskontrolle.

Die Linearität der Bandenintensität im Konzentrationsbereich von 0,1 – 15 µg Gesamtprotein wurde in dieser Arbeit nur aus Nachweisen von repräsentativen Proteinen (Aktin, Bid, RIP, Survivin) bestimmt, wodurch Sättigung für die anderen Proteine nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Allerdings lassen sich bei der jeweils immer durchgeführten qualitativen Beurteilung der Banden die Zeichen von Sättigung (vergrößerte Bande, Überstrahlung) als Ausschlusskriterium für die Verwendung des Blots definieren. Zudem lässt sich die Dichte der Banden



(Graustufen) nach Digitalisierung bestimmen. Ein weiteres Ausschlusskriterium ist somit das Erreichen einer maximalen Dichte (Schwärzungsgrad 255 bei 8-bit-Darstellung). Sowohl für Verdünnungsreihen aus Zelllysaten als auch für Verdünnungsreihen aus Einzelproteinen (die für quantitative Aussagen benötigt werden) ergibt sich die Problematik, dass damit Konzentrationsveränderungen von einzelnen Proteinen in einem Proteingemisch nicht immer optimal abgebildet werden können. Daher können Wechselwirkungen zwischen den restlichen Proteinen und dem untersuchten Protein nicht ausgeschlossen werden, die bei alleiniger Veränderung des untersuchten Proteins nicht mehr zu tragen kämen. Da die Proteine allerdings bei der Elektrophorese nach Molekülgröße aufgetrennt werden, sind relevante Wechselwirkungen unwahrscheinlich.

#### **4.2.2 Problematik der Beladungskontrolle und Eichung anhand von „Housekeeping“-Proteinen**

Für semiquantitative Untersuchungen ist es üblich, die untersuchten Proteine in Beziehung zu einem Protein des Zelllysates zu setzen, das aufgrund seiner Bedeutung für Stoffwechsel oder Struktur der Zelle (sogenannte „Housekeeping“-Proteine) eine angenommene stabile Konzentration im Lysat aufweist. Meist handelt es sich dabei um ein Strukturprotein, hier hat sich Aktin weitestgehend durchgesetzt [56, 57]. In dynamischen Systemen ist es - wie auch in dieser Arbeit gezeigt - zudem möglich, die Konzentration des untersuchten Proteins in Beziehung zur jeweiligen Ausgangskonzentration zu setzen. Dazu muss lediglich sichergestellt sein, dass sich die Proteinkonzentration im linearen Bereich der Beziehung Konzentration/Bandenintensität befindet. Bei dieser Form der Analyse dient Aktin als Beladungskontrolle.

Wie bereits im präanalytischen Komplex (vgl. 3.1.2) erwähnt, befindet sich die Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Bandenintensität bei Aktin in einem nicht-linearen dynamischen Bereich. Durch Einbeziehung nicht-linearer Funktionen in eine quantitative Berechnung geht Information verloren oder wird verfälscht [53]. Theoretisch besteht zwar die Möglichkeit einer entsprechenden Verkürzung der Belichtungszeit, allerdings ist die Dynamik der Intensitätszunahme der Banden bei

## 4. Diskussion

---

sehr kurzen Belichtungszeiten nicht linear und mit den üblichen Labormethoden (manuelle Exposition des Films in Röntgenkassetten) technisch nicht adäquat durchführbar. Bandenintensitäten sind daher bei Belichtungszeiten bis 5 s nicht reproduzierbar (vgl. 3.1.1; [54]). Diesbezüglich böte eine Aufzeichnung der Chemilumineszenz mittels einer CCD-Kamera [58] eine gute Möglichkeit einer linearen Zunahme der Bandenintensität auch bei kurzen Belichtungszeiten. Bei Röntgenfilm-basierten Methoden eignet sich Aktin hingegen nicht oder nur schlecht als Beladungskontrolle für semi-quantitative Analysen.

Allerdings wird durch die BCA-Methode die Proteinkonzentration in den Lysaten vor Beladung bestimmt (vgl. 2.2.2) und damit eine gleiche Beladung ausreichend sichergestellt, so dass unter Hinzunahme der Konzentrationsverläufe der anderen auf dem Blot untersuchten Proteine eine Beladungskontrolle erfolgen kann [34].

### **4.2.3 Synopsis: (Semi-)Quantitative Analysen aus chemilumineszenz-basierten Untersuchungsverfahren**

Westernblot-Analysen sind ein weithin etabliertes Verfahren zur Betrachtung der Proteinexpression und -modulation in Zellen. Standardmäßig werden elektrophoretisch getrennte und durch Blottingverfahren auf Membranen übertragene Proteine durch spezifische Antikörper und indirekte Detektionssysteme nachgewiesen, die auf Chemilumineszenz und Nachweisen auf Röntgenfilm oder direkter digitaler Erfassung der Lumineszenz beruhen. In letzter Zeit stehen auch Systeme zum direkten Nachweis farbstoffmarkierter bzw. fluoreszenzmarkierter Antikörper zur Verfügung. Hierzu gehören das Odyssey-System (Licor) oder das Typhoon-System (GE Healthcare). Dadurch werden in einem weiten Konzentrationspektrum quantitative Analysen möglich [54, 58, 59].

Dennoch weisen auch die indirekten Nachweismethoden über einen weiten Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Chemilumineszenz auf und eignen sich gut für die Umrechnung in (semi-)quantitative Daten [53, 56]. Wichtig sind die mittels serieller Verdünnungsreihen erfassten

Beziehungen zwischen Konzentration der analysierten Proteine und der Intensität der resultierenden Banden. Damit können die Daten als semiquantitative Einheiten ausgedrückt werden. Bereits diese semiquantitativen Daten sind ausreichend zur Eichung computergestützte Modelle zur Modellierung apoptotischer Abläufe [32].

In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der lineare Bereich der Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Bandenintensität bei Beachtung spezieller Qualitätsmerkmale der Banden (siehe 3.1.1) erweitert und die Genauigkeit der Daten damit erhöht werden kann.

### **5 Zusammenfassung**

Viele Pankreasadenokarzinom-Zellen zeichnen sich durch Resistenz gegenüber Noxen und apoptotischen Signalen aus. Dies trifft auch auf die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zelllinien Panc89 und Colo357 zu. Allerdings sind beide Zelllinien nach Stimulierung des Todesrezeptors CD95 nicht komplett resistent. Hier wird die Zelllinie Panc89 als Modell einer resistenten und Colo357 als Modell einer suszeptiblen Zelllinie näher untersucht.

Im Rahmen von Apoptose-Stimulationsversuchen können verschiedene Veränderungen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diese geben Hinweise auf Mechanismen, die, parallel zu apoptotischen Vorgängen oder aber im Rahmen dieser Vorgänge, eine differenzierte Reaktion der Zellen auf Todesrezeptor-Stimulation darstellen. Es zeigt sich, dass zusätzlich zu der konstitutiven Expression apoptoserelevanter Proteine deren Konzentrationsverlauf nach Stimulation ein wichtiger zusätzlicher Parameter der Apoptose ist. Durch diese weitergehende Untersuchung können zusätzliche, auch funktionelle, Erkenntnisse über einzelne Proteine für die Apoptoseresistenz in den untersuchten Zelllinien gewonnen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere der zeitliche Verlauf der Proteinkonzentrationen von Bid, Pro-Caspase-8 und -3 hervorragend mit dem erwarteten Apoptoseverhalten der sensitiveren Colo357-Zellen korreliert. Außerdem unterscheiden sich die Zellen in dieser Hinsicht deutlich von Panc89-Zellen. Diese Ergebnisse werden gestützt durch die unterschiedliche Dynamik der Caspaseaktivität.

Neben diesen deutlichen Unterschieden im Apoptoseverhalten zeigt sich auch bei nicht-apoptotischen Signalwegen eine unterschiedliche Signalweiterleitung. Zudem ergeben sich anhand der Versuche Hinweise auf Veränderungen der Proteinexpression. Die veränderte Proteinexpression stellt somit einen Anpassungsvorgang von Zellen an apoptotische Signale dar, die, wie am Beispiel

von cIAP-1 diskutiert wird, eine verminderte Suszeptibilität gegenüber weiteren apoptotischen Signalen zur Folge haben können. Damit zeigt sich für Typ-II-Zellen ein zusätzlicher Mechanismus von sekundärer Apoptoseresistenz

Zudem ermöglicht die Betrachtung der dynamischen Prozesse im Rahmen der Apoptose und deren semiquantitative Auswertung die zusätzliche Analyse in computergestützten Apoptosemodellen. Dadurch können die Bedeutungen einzelner Proteine für die Stabilität von Resistenzmustern noch genauer bestimmt werden. Die methodischen Voraussetzungen für eine semiquantitative Auswertung von Westernblots wurden in dieser Arbeit definiert und angewendet. Es zeigte sich eine lineare Beziehung der Bandenintensität in Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Proteine. Zudem wurden spezielle Qualitätsstandards für die Verwendung von Westernblot-Banden auf Röntgenfilmen für quantitative Analysen definiert. Durch Einhaltung dieser Standards war es möglich, die Genauigkeit von semi-quantitativen Westernblot-Analysen zu erhöhen.

## 6 Literaturnachweis

1. *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeit und Trends*. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) ed. 2008, Berlin.
2. *Krebs in Deutschland, Krebsregister: 5. überarbeitete und aktualisierte Ausgabe*. Robert Koch-Institut und GEKID ed. 2006, Saarbrücken. 36-8.
3. Gudjonsson, B., *Survival statistics gone awry: pancreatic cancer, a case in point*. J Clin Gastroenterol, 2002. **35**(2): p. 180-4.
4. Beger, H., *Bauchspeicheldrüsenkrebs - Heilungschancen minimal*. Dtsch Arztebl, 2008. **105**(14): p. 255-62.
5. Kroemer, G., L. Galluzzi and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 99-163.
6. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele and Z.N. Berneman, *Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer*. Ann Hematol, 2005. **84**(10): p. 627-39.
7. Turk, B., V. Stoka, J. Rozman-Pungercar, T. Cirman, G. Droga-Mazovec, K. Oresic, and V. Turk, *Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases*. Biol Chem, 2002. **383**(7-8): p. 1035-44.
8. Carswell, E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson, *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
9. Gülow, K., Kaminski, M., and Krammer, P., *The role of CD95/CD95 Ligand Signaling in Apoptosis and Cancer*, in *Apoptosis and Cancer Therapy Part I*. 2006, WILEY-VCH: Weinheim.
10. Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Kramer, and M.E. Peter, *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. Embo J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
11. Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, and A. Ashkenazi, *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
12. Sprick, M.R., M.A. Weigand, E. Rieser, C.T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P.H. Kramer, and H. Walczak, *FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 599-609.
13. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
14. Fischer, U., R.U. Janicke and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.

15. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 2): p. 201-32.
16. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter, *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
17. Barnhart, B.C., E.C. Alappat and M.E. Peter, *The CD95 type I/type II model*. Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 185-93.
18. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
19. Letai, A., M.C. Bassik, L.D. Walensky, M.D. Sorcinelli, S. Weiler, and S.J. Korsmeyer, *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2002. **2**(3): p. 183-92.
20. Kuwana, T., M.R. Mackey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D.R. Green, and D.D. Newmeyer, *Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane*. Cell, 2002. **111**(3): p. 331-42.
21. Wolter, K.G., Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi, and R.J. Youle, *Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis*. J Cell Biol, 1997. **139**(5): p. 1281-92.
22. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed, *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(3): p. 239-52.
23. Roy, N., Q.L. Deveraux, R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed, *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases*. Embo J, 1997. **16**(23): p. 6914-25.
24. Sun, S.C. and S.C. Ley, *New insights into NF-kappaB regulation and function*. Trends Immunol, 2008. **29**(10): p. 469-78.
25. Kreuz, S., D. Siegmund, J.J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich, and H. Wajant, *NF-kappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP*. J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 369-80.
26. Kataoka, T. and J. Tschopp, *N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2627-36.
27. Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich, *Non-apoptotic Fas signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(1): p. 53-66.
28. Hyer, M.L., T. Samuel and J.C. Reed, *The FLIP-side of Fas signaling*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 5929-31.
29. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 26-35.
30. Gupta, S., *Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review)*. Int J Oncol, 2003. **22**(1): p. 15-20.

## 6. Literaturverzeichnis

---

31. Wang, C.Y., M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, and A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.
32. Bentele, M., I. Lavrik, M. Ulrich, S. Stosser, D.W. Heermann, H. Kalthoff, P.H. Krammer, and R. Eils, *Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis*. *J Cell Biol*, 2004. **166**(6): p. 839-51.
33. Sipos, B., S. Moser, H. Kalthoff, V. Torok, M. Lohr, and G. Kloppel, *A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform*. *Virchows Arch*, 2003. **442**(5): p. 444-52.
34. Chopard, A., F. Pons, P. Charpiot, and J.F. Marini, *Quantitative analysis of relative protein contents by Western blotting: comparison of three members of the dystrophin-glycoprotein complex in slow and fast rat skeletal muscle*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(3): p. 517-22.
35. Qiao, L. and G.C. Farrell, *Reciprocal control of apoptosis and proliferation in cultured rat hepatoma arl-6 cells: roles of nutrient supply, serum, and oxidative stress*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000. **36**(7): p. 465-75.
36. Matsuzaki, H., B.M. Schmied, A. Ulrich, J. Standop, M.B. Schneider, S.K. Batra, K.S. Picha, and P.M. Pour, *Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL-resistant human pancreatic cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(2): p. 407-14.
37. Trauzold, A., S. Schmiedel, C. Roder, C. Tams, M. Christgen, S. Oestern, A. Arlt, S. Westphal, M. Kapischke, H. Ungefroren, and H. Kalthoff, *Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(9): p. 1714-21.
38. Hinz, S., A. Trauzold, L. Boenicke, C. Sandberg, S. Beckmann, E. Bayer, H. Walczak, H. Kalthoff, and H. Ungefroren, *Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis*. *Oncogene*, 2000. **19**(48): p. 5477-86.
39. Trauzold, A., H. Wermann, A. Arlt, S. Schutze, H. Schafer, S. Oestern, C. Roder, H. Ungefroren, E. Lampe, M. Heinrich, H. Walczak, and H. Kalthoff, *CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(31): p. 4258-69.
40. Siegmund, D., S. Klose, D. Zhou, B. Baumann, C. Roder, H. Kalthoff, H. Wajant, and A. Trauzold, *Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells*. *Cell Signal*, 2007. **19**(6): p. 1172-84.
41. Zhao, X.H., S.Z. Gu, H.G. Tian, P. Quan, and B.R. Pan, *Clinical significance of expression of apoptotic signal proteins in gastric carcinoma tissue*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(25): p. 3846-9.



42. O'Reilly, L.A., U. Divisekera, K. Newton, K. Scalzo, T. Kataoka, H. Puthalakath, M. Ito, D.C. Huang, and A. Strasser, *Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(7): p. 724-36.
43. Trauzold, A., C. Roder, B. Sipos, K. Karsten, A. Arlt, P. Jiang, J.I. Martin-Subero, D. Siegmund, S. Muerkoster, L. Pagerols-Raluy, R. Siebert, H. Wajant, and H. Kalthoff, *CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells*. *Faseb J*, 2005. **19**(6): p. 620-2.
44. Park, S.M., R. Schickel and M.E. Peter, *Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(6): p. 610-6.
45. Lin, Y., A. Devin, A. Cook, M.M. Keane, M. Kelliher, S. Lipkowitz, and Z.G. Liu, *The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of I $\kappa$ B kinase and c-Jun N-terminal kinase*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(18): p. 6638-45.
46. Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez, and Z.G. Liu, *Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis*. *Genes Dev*, 1999. **13**(19): p. 2514-26.
47. Harper, N., S.N. Farrow, A. Kaptein, G.M. Cohen, and M. MacFarlane, *Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF- $\kappa$ B activation by inhibition of apical caspases*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(37): p. 34743-52.
48. Hu, W.H., H. Johnson and H.B. Shu, *Activation of NF- $\kappa$ B by FADD, Casper, and caspase-8*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(15): p. 10838-44.
49. Li, X., Y. Yang and J.D. Ashwell, *TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2*. *Nature*, 2002. **416**(6878): p. 345-7.
50. Tanimoto, T., H. Tsuda, N. Imazeki, Y. Ohno, I. Imoto, J. Inazawa, and O. Matsubara, *Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas*. *Cancer Lett*, 2005. **224**(1): p. 141-51.
51. Kempkensteffen, C., S. Hinz, F. Christoph, J. Kollermann, H. Krause, M. Schrader, M. Schostak, K. Miller, and S. Weikert, *Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(5): p. 1081-6.
52. Trauzold, A., S. Schmiedel, S. Oestern, M. Christgen, S. Westphal, C. Roederm, and H. Kalthoff, *Concerted deregulations of multiple apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **1010**: p. 510-3.
53. Heidebrecht, F., A. Heidebrecht, I. Schulz, S.E. Behrens, and A. Bader, *Improved semiquantitative Western blot technique with increased quantification range*. *J Immunol Methods*, 2009. **345**(1-2): p. 40-8.
54. Zellner, M., R. Babeluk, M. Diestinger, P. Pirchegger, S. Skeledzic, and R. Oehler, *Fluorescence-based Western blotting for quantitation of protein biomarkers in clinical samples*. *Electrophoresis*, 2008. **29**(17): p. 3621-7.

## 6. Literaturverzeichnis

---

55. Schilling, M., T. Maiwald, S. Bohl, M. Kollmann, C. Kreutz, J. Timmer, and U. Klingmuller, *Computational processing and error reduction strategies for standardized quantitative data in biological networks*. *Febs J*, 2005. **272**(24): p. 6400-11.
56. Roman-Blas, J.A., D.G. Stokes and S.A. Jimenez, *Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(12): p. 1367-77.
57. Chen, E., Y.T. Kwon, M.S. Lim, I.D. Dube, and M.R. Hough, *Loss of Ubr1 promotes aneuploidy and accelerates B-cell lymphomagenesis in TLX1/HOX11-transgenic mice*. *Oncogene*, 2006. **25**(42): p. 5752-63.
58. Feather-Henigan K, H.S., Johnson A, Milosevich GM & Hines K, *Immunoblot imaging with a cooled CCD camera and chemiluminescent substrates*. *Am Biotechnol Lab*, 1999. **17**: p. 44-46.
59. Donoghue, P.M., C.A. McManus, N.M. O'Donoghue, S.R. Pennington, and M.J. Dunn, *CyDye immunoblotting for proteomics: co-detection of specific immunoreactive and total protein profiles*. *Proteomics*, 2006. **6**(24): p. 6400-4.

## **7 Tabellarischer Anhang**

In diesem Kapitel sind sämtliche analysierten Daten aufgeführt.

Die tabellarische Auflistung enthält jeweils als Überschrift die Zelllinie, auf die sich die Daten beziehen sowie, ob in der Tabelle Daten der unstimulierten Kontrolle oder der CH11-stimulierten Zellen aufgeführt sind. Die Experimente zur Erzeugung von Westernblot-Datensätzen haben die Buchstabenbezeichnung „W“ sowie als Zusatz einen Zahlencode. Die erste Zahl bezieht sich auf die Wiederholung (Experiment 1 und 2), die Zahl hinter dem Punkt auf die Nummer des Alliquots. Die Bezeichnung „d“ heißt dabei, dass für diesen Westernblot die doppelte Proteinmenge (entsprechend 2 Alliquots) verwendet wurde. Diese Blots wurden benötigt, um Proteine mit schwachen Banden besser abzubilden.

Den Caspaseaktivitäts-Assays sind Daten eines bisher unveröffentlichten Experimentes beigefügt, das allerdings nicht alle für die Arbeit nötigen Zeitpunkte abdeckt.

<b>Kontrolle Panc89</b>									
Panc89 - W1.1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
clAP1	2472	2674	2371	2606	2039	3475	2335	1312	2076
	1,00	1,08	0,96	1,05	0,82	1,41	0,94	0,53	0,84
Bax	1657	1803	1126	1515	1853	1210	1561	1611	514
	1,00	1,09	0,68	0,91	1,12	0,73	0,94	0,97	0,31
Panc89 - W1.2									
Caspase 8	2816	2887	2361	2556	2890	1583	2732	2885	3878
	1,00	1,03	0,84	0,91	1,03	0,56	0,97	1,02	1,38
Bid	2708	3130	2564	3077	3138	1944	3152	3099	1168
	1,00	1,16	0,95	1,14	1,16	0,72	1,16	1,14	0,43
Panc89 - W1.3									
RIP	3918	2948	2740	2898	2865	2554	2621	2893	509
	1,00	0,75	0,70	0,74	0,73	0,65	0,67	0,74	0,13
Caspase 3	2494	1801	1722	1709	2064	1956	1508	2171	1884
	1,00	0,72	0,69	0,69	0,83	0,78	0,60	0,87	0,76
Panc89 - W1.4									
TRAF2(a)	2295	2039	1668	1368	1737	1011	1863	1932	1013
	1,00	0,89	0,73	0,60	0,76	0,44	0,81	0,84	0,44
FADD	2957	3227	2707	3080	3839	2176	2972	2029	2474
	1,00	1,09	0,92	1,04	1,30	0,74	1,01	0,69	0,84
Panc89 - W1.d									
Xiap	1409	1447	974	1046	1387	477	836	740	1205
	1,00	1,03	0,69	0,74	0,98	0,34	0,59	0,53	0,86
clAP2	1062	957	799	915	1196	542	809	687	563
	1,00	0,90	0,75	0,86	1,13	0,51	0,76	0,65	0,53

<b>CH11-Stimulation Panc89</b>									
Panc89 - W1.1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
clAP1	1481	3051	2083	2749	2136	2542	2562	1935	1828
	0,71	1,46	1,00	1,32	1,03	1,22	1,23	0,93	0,88
Bax	1995	2726	2097	2143	2242	1901	1513	1506	1298
	1,00	1,37	1,05	1,07	1,12	0,95	0,76	0,75	0,65
Panc89 - W1.2	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 8	4655	5057	3887	2832	4140	2560	1923	1379	1363
	1,00	1,09	0,84	0,61	0,89	0,55	0,41	0,30	0,29
Bid	1730	2867	2095	1661	2311	1501	1025	1395	1039
	1,00	1,66	1,21	0,96	1,34	0,87	0,59	0,81	0,60
Panc89 - W1.3	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
RIP	2924	2861	1661	1596	2099	1543	1232	1107	1527
	1,00	0,98	0,57	0,55	0,72	0,53	0,42	0,38	0,52
Caspase 3	1746	2257	1126	1158	1265	817	318	355	216
	1,00	1,29	0,64	0,66	0,72	0,47	0,18	0,20	0,12
Panc89 - W1.4	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
TRAF2(a)	2227	2268	2509	2397	2733	2068	2667	2656	1671
	1,00	1,02	1,13	1,08	1,23	0,93	1,20	1,19	0,75
FADD	349	983	206	333	806	400	201	246	353
	1,00	2,82	0,59	0,95	2,31	1,15	0,58	0,70	1,01
Panc89 - W1.d	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Xiap	3297	3871	3125	3162	3727	2806	1856	2694	1762
	1,00	1,17	0,95	0,96	1,13	0,85	0,56	0,82	0,53
clAP2	2728	2937	2507	2593	2491	2069	1775	1909	1850
	1,00	1,08	0,92	0,95	0,91	0,76	0,65	0,70	0,68

<b>Kontrolle Panc89</b>									
Panc89 - W2.1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
clAP1	2229	2690	2963	2160	2775	2912	2358	2066	2106
	1,00	1,21	1,33	0,97	1,24	1,31	1,06	0,93	0,94
Bax	1414	1982	1107	2096	1828	1395	1062	1603	1175
	1,00	1,40	0,78	1,48	1,29	0,99	0,75	1,13	0,83
Panc89 - W2.2	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 8	4845	4822	3844	4042	4977	3242	3692	3405	3349
	1,00	1,00	0,79	0,83	1,03	0,67	0,76	0,70	0,69
Bid	3914	4200	3828	3862	4097	3295	3564	3770	3357
	1,00	1,07	0,98	0,99	1,05	0,84	0,91	0,96	0,86
Panc89 - W2.3	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
RIP	2667	3114	2063	2913	2814	2143	2362	2587	2316
	1,00	1,17	0,77	1,09	1,06	0,80	0,89	0,97	0,87
Caspase 3	2589	2939	2248	3084	2822	2396	2362	2577	2391
	1,00	1,14	0,87	1,19	1,09	0,93	0,91	1,00	0,92
Panc89 - W2.4	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
TRAF2	2360	2153	1866	2152	2280	1829	2143	2659	2258
	1,00	0,91	0,79	0,91	0,97	0,78	0,91	1,13	0,96
FADD	3921	5225	4728	4851	4798	4034	3654	3961	3582
	1,00	1,33	1,21	1,24	1,22	1,03	0,93	1,01	0,91
Panc89 - W2.d	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Xiap	910	720	448	750	933	339	479	844	695
	1,00	0,79	0,49	0,82	1,03	0,37	0,53	0,93	0,76
clAP2	1224	1018	742	893	762	449	675	577	545
	1,00	0,83	0,61	0,73	0,62	0,37	0,55	0,47	0,45

<b>CH11-Stimulation Panc89</b>									
Panc89 - W2.1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
clAP1	2181	2296	3028	2497	2396	3172	4071	3186	2384
	1,00	1,05	1,39	1,14	1,10	1,45	1,87	1,46	1,09
Bax	960	1117	1546	1192	2158	1388	856	1117	658
	1,00	1,16	1,61	1,24	2,25	1,45	0,89	1,16	0,69
Panc89 - W2.2	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 8	4149	3870	3856	3331	4428	2294	3041	2800	2362
	1,00	0,93	0,93	0,80	1,07	0,55	0,73	0,67	0,57
Bid	3297	3463	3835	3803	3965	2740	3039	2827	2029
	1,00	1,05	1,16	1,15	1,20	0,83	0,92	0,86	0,62
Panc89 - W2.3	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
RIP	1560	1827	1603	1780	2412	1527	1661	1280	1099
	1,00	1,17	1,03	1,14	1,55	0,98	1,06	0,82	0,70
Caspase 3	2665	2462	2171	1879	2424	1401	1703	1156	1094
	1,00	0,92	0,81	0,71	0,91	0,53	0,64	0,43	0,41
Panc89 - W2.4	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
TRAF2	2370	2037	1823	1993	2033	1881	1153	2021	1169
	1,00	0,86	0,77	0,84	0,86	0,79	0,49	0,85	0,49
FADD	3356	3421	4630	3005	3794	2084	2223	2763	493
	1,00	1,02	1,38	0,90	1,13	0,62	0,66	0,82	0,15
Panc89 - W2.d	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Xiap	1365	1909	1713	1291	1203	1435	954	535	347
	1,00	1,40	1,25	0,95	0,88	1,05	0,70	0,39	0,25
clAP2	1322	1899	1850	1532	1523	1523	1567	876	548
	1,00	1,44	1,40	1,16	1,15	1,15	1,19	0,66	0,41

<b>Kontrolle Colo357</b>									
Colo357 - W1.3	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 3	2110	2427	2373	2247	2511	1831	2719	2055	1841
	1,00	1,15	1,12	1,06	1,19	0,87	1,29	0,97	0,87
Caspase 3(2)	4712	4603	4158	4010	4195	3956	4874	4192	3582
	1,00	0,98	0,88	0,85	0,89	0,84	1,03	0,89	0,76
Bax	171	196	250	241	226	146	349	111	318
	1,00	1,15	1,46	1,41	1,32	0,85	2,04	0,65	1,86
cIAP1	923	1219	1097	1150	976	1085	1555	940	340
	1,00	1,32	1,19	1,25	1,06	1,18	1,68	1,02	0,37
RIP	2457	2839	2490	2886	2546	1745	3283	2319	5186
	1,00	1,16	1,01	1,17	1,04	0,71	1,34	0,94	2,11
Colo357 - W1.4	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Bid	1545	1905	2261	2274	1882	1417	2535	1979	2394
	1,00	1,23	1,46	1,47	1,22	0,92	1,64	1,28	1,55
Caspase 8	2645	2983	3196	3241	2588	1999	3157	2926	923
	1,00	1,13	1,21	1,23	0,98	0,76	1,19	1,11	0,35
FADD	2833	2823	3460	4126	3878	3784	4533	4052	1473
	1,00	1,00	1,22	1,46	1,37	1,34	1,60	1,43	0,52
TRAF2	2296	2349	2187	1994	1694	1635	2235	1928	2643
	1,00	1,02	0,95	0,87	0,74	0,71	0,97	0,84	1,15
Colo357 - W1.d	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Xiap									
cIAP2	1653	2038	1897	1515	2267	1735	3089	1869	1856
	1,00	1,23	1,15	0,92	1,37	1,05	1,87	1,13	1,12



<b>CH11-Stimulation Colo357</b>									
Colo357 - W1.1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
clAP1	1433	1652	1133	860	1283	1464	1345	1936	2187
	1,00	1,15	0,79	0,60	0,90	1,02	0,94	1,35	1,53
Bax	2979	3856	3807	3334	2855	2289	1654	1880	1322
	1,00	1,29	1,28	1,12	0,96	0,77	0,56	0,63	0,44
Colo357 - W1.2	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 8	5668	5203	4565	3951	2204	1493	649	807	739
	1,00	0,92	0,81	0,70	0,39	0,26	0,11	0,14	0,13
Bid	4632	4574	3786	3101	1058	470	115	303	271
	1,00	0,99	0,82	0,67	0,23	0,10	0,02	0,07	0,06
Colo357 - W1.3	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
RIP	3001	2558	2720	1845	590	600	138	260	283
	1,00	0,85	0,91	0,61	0,20	0,20	0,05	0,09	0,09
Caspase 3	9102	8105	8003	6024	1286	240			
	1,00	0,89	0,88	0,66	0,14	0,03	0,00	0,00	0,00
Colo357 - W1.4	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
TRAF2	3717	3008	2931	2527	1331	1216	424	937	750
	1,00	0,81	0,79	0,68	0,36	0,33	0,11	0,25	0,20
FADD	2624	2358	2934	2866	1686	2015	377	1625	1349
	1,00	0,90	1,12	1,09	0,64	0,77	0,14	0,62	0,51
Colo357 - W1.d	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Xiap	3290	3488	3138	2712	1538	1044	235	577	535
	1,00	1,06	0,95	0,82	0,47	0,32	0,07	0,18	0,16
clAP2	2028	2097	2198	1844	1531	1464	571	1211	781
	1,00	1,03	1,08	0,91	0,75	0,72	0,28	0,60	0,39

<b>Kontrolle Colo357</b>									
Colo357 - W2.1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Bax	1042	988	1022	710	1065	933	872	689	602
	1,00	0,95	0,98	0,68	1,02	0,90	0,84	0,66	0,58
clAP1	2331	2284	2213	2251	2439	3039	2438	1970	1912
	1,00	0,98	0,95	0,97	1,05	1,30	1,05	0,85	0,82
RIP	3361	3346	3660	3298	3006	2822	2530	2794	2911
	1,00	1,00	1,09	0,98	0,89	0,84	0,75	0,83	0,87
Caspase 3	4353	4577	4575	4389	4611	3921	3773	3838	3971
	1,00	1,05	1,05	1,01	1,06	0,90	0,87	0,88	0,91
Colo357 - W2.2	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Bid	1856	1901	2204	2027	1873	1373	1195	1232	1403
	1,00	1,02	1,19	1,09	1,01	0,74	0,64	0,66	0,76
Caspase 8	4827	4633	5120	5159	4966	3985	3510	3079	3556
	1,00	0,96	1,06	1,07	1,03	0,83	0,73	0,64	0,74
FADD	2777	2988	2655	3164	3050	2065	2283	2005	1930
	1,00	1,08	0,96	1,14	1,10	0,74	0,82	0,72	0,69
TRAF2	2100	1946	1589	1525	1499	1102	1203	1152	1567
	1,00	0,93	0,76	0,73	0,71	0,52	0,57	0,55	0,75
Colo357 - W2.d	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Xiap	3737	3435	3651	3553	3590	2836	2693	2890	3063
	1,00	0,92	0,98	0,95	0,96	0,76	0,72	0,77	0,82
clAP2	2085	2075	2293	1956	2140	1502	2005	1698	1656
	1,00	1,00	1,10	0,94	1,03	0,72	0,96	0,81	0,79

<b>CH11-Stimulation Colo357</b>									
Colo357 - W2.1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Bax	669	839	812	464	272	344	275	238	
	1,00	1,25	1,21	0,69	0,41	0,51	0,41	0,36	0,00
clAP1	2276	2813	2165	2189	2679	3335	3056	2821	2050
	1,00	1,24	0,95	0,96	1,18	1,47	1,34	1,24	0,90
RIP	2997	3029	3035	2515	887	1197	651	1041	345
	1,00	1,01	1,01	0,84	0,30	0,40	0,22	0,35	0,12
Colo357 - W2.2	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Bid	1231	1405	1324	742	144	69			
	1,00	1,14	1,08	0,60	0,12	0,06	0,00	0,00	0,00
Caspase 8	2838	3817	4425	2954	1135	1055	573	567	300
	1,00	1,34	1,56	1,04	0,40	0,37	0,20	0,20	0,11
FADD	1664	2671	3386	2732	2731	2594	2783	3029	1902
	1,00	1,61	2,03	1,64	1,64	1,56	1,67	1,82	1,14
TRAF2	1905	1959	1978	1641	1109	934	950	1009	544
	1,00	1,03	1,04	0,86	0,58	0,49	0,50	0,53	0,29
Caspase 3	4641	4370	6407	1616					
	1,00	0,94	1,38	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Colo357 - W2.d	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Xiap	2371	3305	3474	2943	883	979	393	558	367
	1,00	1,39	1,47	1,24	0,37	0,41	0,17	0,24	0,15
clAP2	1575	2497	2570	2674	1759	1968	1458	1764	1349
	1,00	1,59	1,63	1,70	1,12	1,25	0,93	1,12	0,86

<b>Aktinwerte, Kontrolle Panc89</b>									
	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
W1.1	2509	2983	2623	2965	2785	2696	3066	2602	2353
	1,00	1,19	1,05	1,18	1,11	1,07	1,22	1,04	0,94
W1.2	2991	3148	2651	2809	2886	2749	2896	2697	2851
	1,00	1,05	0,89	0,94	0,96	0,92	0,97	0,90	0,95
W1.3	2464	2332	2650	2680	2653	2561	3086	2503	2450
	1,00	0,95	1,08	1,09	1,08	1,04	1,25	1,02	0,99
W1.4	2434	1935	1195	2042	2834	2512	2423	2508	1765
	1,00	0,79	0,49	0,84	1,16	1,03	1,00	1,03	0,73
W1.d	3254	2828	2519	2554	2588	2642	2749	2349	2886
	1,00	0,87	0,77	0,78	0,80	0,81	0,84	0,72	0,89
	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
W2.1	2631	2251	2204	2455	2468	2632	2728	2571	1839
	1,00	0,86	0,84	0,93	0,94	1,00	1,04	0,98	0,70
W2.2	2530	2634	2763	2868	2857	2754	2827	2114	2385
	1,00	1,04	1,09	1,13	1,13	1,09	1,12	0,84	0,94
W2.3	2430	2338	2411	2436	2582	2581	2303	1998	2020
	1,00	0,96	0,99	1,00	1,06	1,06	0,95	0,82	0,83
W2.4	2424	2154	2222	2322	2682	2375	2363	2374	2196
	1,00	0,89	0,92	0,96	1,11	0,98	0,97	0,98	0,91
W2.d	3506	3319	2927	3257	2839	2589	2625	2328	2199
	1,00	0,95	0,83	0,93	0,81	0,74	0,75	0,66	0,63

<b>Aktinwerte, CH11-Stimulation Panc89</b>										
	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24	
W1.1	3033	2994	2407	2526	2353	2380	2485	2462	2361	
	1,00	0,99	0,79	0,83	0,78	0,78	0,82	0,81	0,78	
W1.2	2914	2742	2311	2436	2622	2497	2614	2428	2408	
	1,00	0,94	0,79	0,84	0,90	0,86	0,90	0,83	0,83	
W1.3	3161	3020	2147	2379	2519	2888	2179	2511	2746	
	1,00	0,96	0,68	0,75	0,80	0,91	0,69	0,79	0,87	
W1.4	1843	2045	1627	1693	1827	2039	2292	2140	1885	
	1,00	1,11	0,88	0,92	0,99	1,11	1,24	1,16	1,02	
W1.d	4441	3650	3159	3379	3245	3568	3172	3612	3929	
	1,00	0,82	0,71	0,76	0,73	0,80	0,71	0,81	0,88	
	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24	
W2.1	2236	2009	2118	1981	2173	2052	2126	1975	1823	
	1,00	0,90	0,95	0,89	0,97	0,92	0,95	0,88	0,82	
W2.2	2298	2070	2532	2601	2235	2323	2334	2285	2047	
	1,00	0,90	1,10	1,13	0,97	1,01	1,02	0,99	0,89	
W2.3	2880	2668	2509	2257	2436	2642	2728	2096	1882	
	1,00	0,93	0,87	0,78	0,85	0,92	0,95	0,73	0,65	
W2.4	2443	2122	2235	2414	2691	2755	2978	2825	2741	
	1,00	0,87	0,91	0,99	1,10	1,13	1,22	1,16	1,12	
W2.d	3385	3395	2996	3110	3452	3571	3543	3483	2752	
	1,00	1,00	0,89	0,92	1,02	1,05	1,05	1,03	0,81	

<b>Aktinwerte, Colo357 (Kontrolle und CH11-Stimulation)</b>									
Kontrolle	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
W1.1	2859	2484	2513	2327	1996	2418	2526	2093	2392
	1,00	0,87	0,88	0,81	0,70	0,85	0,88	0,73	0,84
W1.2	2523	2657	1949	2508	2424	2571	2627	2425	2473
	1,00	1,05	0,77	0,99	0,96	1,02	1,04	0,96	0,98
W1.d	2052	1899	1787	1812	1710	1530	1570	1389	1634
	1,00	0,93	0,87	0,88	0,83	0,75	0,77	0,68	0,80
Kontrolle	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
W2.1	3277	3946	3320	3319	4086	3699	3481	3050	2619
	1,00	1,20	1,01	1,01	1,25	1,13	1,06	0,93	0,80
W2.2	3681	3623	3641	3751	3878	4104	4175	3788	3843
	1,00	0,98	0,99	1,02	1,05	1,11	1,13	1,03	1,04
W2.d	2118	1666	1533	1878	2458	2361	1885	1862	2091
	1,00	0,79	0,72	0,89	1,16	1,11	0,89	0,88	0,99
CH11-Stimulation	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
W1.1	3318	3446	2966	2879	2287	2310	2521	2786	2960
	1,00	1,04	0,89	0,87	0,69	0,70	0,76	0,84	0,89
W1.2	3304	3456	2803	2902	2866	2872	3022	3335	2887
	1,00	1,05	0,85	0,88	0,87	0,87	0,91	1,01	0,87
W1.3	3062	2969	2843	2591	2054	2547	2833	2958	2827
	1,00	0,97	0,93	0,85	0,67	0,83	0,93	0,97	0,92
W1.4	2404	2261	2692	2744	2655	2919	2801	2995	2763
	1,00	0,94	1,12	1,14	1,10	1,21	1,17	1,25	1,15
W1.d	1651	1755	1247	1433	1532	1327	1219	1259	1243
	1,00	1,06	0,76	0,87	0,93	0,80	0,74	0,76	0,75
W2.1	3206	3857	3886	3200	2897	1936	1405	925	819
	1,00	1,20	1,21	1,00	0,90	0,60	0,44	0,29	0,26
W2.2	3336	4416	4143	3736	3830	3598	3875	3200	3270
	1,00	1,32	1,24	1,12	1,15	1,08	1,16	0,96	0,98
W2.d	1625	1529	1718	1752	1532	1762	1695	1772	1762
	1,00	0,94	1,06	1,08	0,94	1,08	1,04	1,09	1,08

<b>Caspaseaktivitäts-Assay Panc89</b>									
Versuch A1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 3 Kontrolle	1126	1167	1207	1221	1235	1265	1254	1459	1376
	1,00	1,04	1,07	1,08	1,10	1,12	1,11	1,30	1,22
	1126	1206	1256	2318	1,42E+04	1,78E+04	2,05E+04	1,54E+04	9583
CH11	1,00	1,07	1,12	2,06	12,61	15,81	18,21	13,68	8,51
Caspase 8 Kontrolle	1483	1668	1644	1834	1774	1786	1975	2123	1815
	1,00	1,12	1,11	1,24	1,20	1,20	1,33	1,43	1,22
	1470	1688	1639	1836	4555	5542	6598	5396	3608
CH11	1,00	1,15	1,11	1,25	3,10	3,77	4,49	3,67	2,45
Caspase 9 Kontrolle	841,7	847,7	849,8	879	843,2	869,2	897	938,7	879,1
	1,00	1,01	1,01	1,04	1,00	1,03	1,07	1,12	1,04
	721,1	834,1	855,4	928,1	2168	2599	3095	2532	1766
CH11	1,00	1,16	1,19	1,29	3,01	3,60	4,29	3,51	2,45
Alte Datensätze	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 3 Kontrolle	43,13				34,11				82,28
	1,00				0,79				1,91
	31,02	34,33	34,595	96,14	186,35				392,25
CH11	1,00	1,11	1,12	3,10	6,01				12,65
Caspase 8 Kontrolle	52,755				61,74				181,7
	1,00				1,17				3,44
	54,7	57,72	58,96	62,385	110				428,1
CH11	1,00	1,06	1,08	1,14	2,01				7,83
Caspase 9 Kontrolle	41,155				41,42				52,975
	1,00				1,01				1,29
	40,945	39,55	40,1	42,86	62,395				91,66
CH11	1,00	0,97	0,98	1,05	1,52				2,24

<b>Caspaseaktivitäts-Assay Colo357</b>									
Versuch A1	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 3 Kontrolle	1212	1241	1418	1235	1615	1209	1236	1402	1132
	1,00	1,02	1,17	1,02	1,33	1,00	1,02	1,16	0,93
CH11	1173	1493	2649	1,75E+04	1,65E+04	1,16E+04	7379	9143	3074
	1,00	1,27	2,26	14,92	14,07	9,89	6,29	7,79	2,62
Caspase 8 Kontrolle	1465	1922	2615	1872	2077	1948	1995	2408	1582
	1,00	1,31	1,78	1,28	1,42	1,33	1,36	1,64	1,08
CH11	1311	2237	957,4	5175	5251	4075	2829	2000	4215
	1,00	1,71	0,73	3,95	4,01	3,11	2,16	1,53	3,22
Caspase 9 Kontrolle	770,6	822,2	899,6	798	835,3	814,4	768,9	895	788,4
	1,00	1,07	1,17	1,04	1,08	1,06	1,00	1,16	1,02
CH11	723,5	811,4	928,6	2422	2446	1824	1441	1008	1508
	1,00	1,12	1,28	3,35	3,38	2,52	1,99	1,39	2,08
Alte Datensätze	0,25	0,5	1	3	6	9	12	18	24
Caspase 3 Kontrolle	86,24				78,425				145,9
	1,00				0,91				1,69
CH11	48,42	46,98	151,1	588,3	450,3				193,35
	1,00	0,97	3,12	12,15	9,30				3,99
Caspase 8 Kontrolle	97,665				144,45				223,45
	1,00				1,48				2,29
CH11	75,275	95,595	103,85	430,9	243,5				127,85
	1,00	1,27	1,38	5,72	3,23				1,70
Caspase 9 Kontrolle	52,215				53,585				69,975
	1,00				1,03				1,34
CH11	42,19	46,825	47,99	207,9	127,6				64,26
	1,00	1,11	1,14	4,93	3,02				1,52



**Zellzahlen Panc89 und Colo357**

	Zellzahlen Panc89		
	Unstimuliert	CH11-stimuliert	Überstand
0h	2,76E+05	2,85E+05	
0,25h	2,51E+05	2,20E+05	
0,5h	2,30E+05	2,40E+05	
1h	2,24E+05	2,64E+05	7,13E+03
3h	2,91E+05	2,83E+05	2,91E+04
6h	3,32E+05	2,53E+05	1,16E+05
9h	2,63E+05	2,54E+05	3,24E+04
12h	4,55E+05	4,30E+05	5,13E+04
18h	5,44E+05	5,37E+05	6,69E+04
24h	5,31E+05	4,65E+05	6,70E+04
	Zellzahlen Colo357		
	Unstimuliert	CH11-stimuliert	Überstand
0h	2,86E+05	1,89E+05	
0,25h	2,60E+05	2,48E+05	
0,5h	2,59E+05	3,01E+05	
1h	2,78E+05	3,23E+05	1,60E+04
3h	3,08E+05	3,25E+05	4,33E+04
6h	2,64E+05	3,87E+05	2,93E+04
9h	3,16E+05	2,10E+05	1,08E+05
12h	4,78E+05	2,85E+05	1,99E+05
18h	5,89E+05	2,10E+05	2,48E+05
24h	5,60E+05	1,90E+05	1,79E+05

**Konstitutive Expression, Inhibitor of Apoptosis-Proteine**

<b>c-IAP2</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
110302-7b		4375	4945	5555	5461	5691
		1588	295	14248	2398	
		1,00	0,19	8,97	1,51	
<b>XIAP</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
070302-X+C7-e		7195	6773	5651	4702	4983
		677	1954	5779	2663	7600
		1,00	2,89	8,54	3,93	11,23
<b>Survivin</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
130901-4(10")		7114	5650	6625	5979	6225
		7003	3323	3990	5859	3734
		2,11	1,00	1,20	1,76	1,12
060302-1b		5706	5886	6245	6399	7061
		1864	2501	6625	3173	5792
		1,00	1,34	3,55	1,70	3,11

## 7. Tabellarischer Anhang

### Konstitutive Expression, Bcl2-Proteine

<b>Bid</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin	5949	4655	5652	4581	3048	4340
070301-Bid(3')	7032	2441	813	4061	2642	2279
	1,00	0,35	0,12	0,58	0,38	0,32
Aktin	6210	3278	3748	3753	3090	4627
100401-Bid(rabbit)(15")	7332	3787	92	1896	852	700
	1,00	0,52	0,01	0,26	0,12	0,10
<b>Bad</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin	9157	5600	5946	5641	6600	6959
080302-Bad-8a	7493	3008	4975	5684	5805	4254
	1,00	0,40	0,66	0,76	0,77	0,57
<b>Bcl-XL</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin	7213	5587	6505	6006	6103	5670
140901-3bc(3')	755	1477	1386	5734	2325	2740
	1,00	1,96	1,84	7,59	3,08	3,63
Aktin	6411	7152	8214	6789	7147	7302
151200-Bcl	518	972	504	9023	2580	3288
	1,00	1,88	0,97	17,42	4,98	6,35
<b>Bax</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin		4960	4360	3647	4247	3372
100901-M124		7978	4319	6333	6692	4508
		1,00	0,54	0,79	0,84	0,57
Aktin		3848	5504	7256	7548	6144
090402-Bax(1')		6579	5799	4791	5475	3018
		1,00	0,88	0,73	0,83	0,46

**Konstitutive Expression**

<b>FLIP</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin	6234	6453	5420	6404	5359	6034
060301-FLIP	522	1717	3111	2803	1616	4827
	0,30	1,00	1,81	1,63	0,94	2,81
Aktin		4375	4945	5555	5461	5691
070302-7a		2003	4805	5361	2346	4937
		1,00	2,40	2,68	1,17	2,46
<b>FADD</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin		5203	4443	4171	4290	3524
100901-M126(60")		9056	10973	5854	8147	8687
		1,00	1,21	0,65	0,90	0,96
Aktin	6834	4578	4704	5161	5063	5829
110302-6	3280	9030	9546	4432	5611	5254
	0,36	1,00	1,06	0,49	0,62	0,58
<b>TRAF-2</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin		6918	6321	6676	5884	6983
200901-TRAF2		5691	1224	10591	7689	8132
		1,00	0,22	1,86	1,35	1,43
Aktin		5519	5767	6084	6402	6482
060302-TRAF2(Blot Nr.2)		6466	357	8813	6225	7073
		1,00	0,06	1,36	0,96	1,09
<b>RIP</b>	Jurkat	Capan	Colo357	PancTu1	Panc 89	Panc 1
Aktin	7213	5587	6505	6006	6103	5670
130901-3(10")	837	636	1784	3688	7123	8480
	1,32	1,00	2,81	5,80	11,20	13,33
Aktin		4859	5361	6927	5645	6528
060302-3a		902	316	3742	6704	7110
		1,00	0,35	4,15	7,43	7,88

## **Danksagung**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde vom Februar 2003 bis September 2004 in der Sektion für Molekulare Onkologie, Institut für Experimentelle Tumorforschung / Krebszentrum Nord – CCC, am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, angefertigt.

Danken möchte ich

- Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit der freien Schwerpunktsetzung.
- Frau Dr. Sabine Westphal für die Einarbeitung, die tatkräftige Mithilfe und die stets freundliche Unterstützung.
- Herrn Dr. Christian Röder für die vielen hilfreichen Anregungen und die Mithilfe bei der Erarbeitung der theoretischen Grundlagen. Des Weiteren für die Korrektur der schriftlichen Arbeit.
- Frau Dr. Ania Trauzold für die Bereitstellung der Blots der konstitutiven Expression der in dieser Arbeit untersuchten Proteine in verschiedenen Zelllinien zur weiteren Auswertung sowie für die stets fundierten Anmerkungen zu den Abläufen der Apoptose.
- Herrn Dr. Martin Bentele und Herrn Prof. Dr. Roland Eils für die Einblicke in die mathematischen Modelle zur Erfassung apoptotischer Prozesse und den dadurch gewonnenen Blickwinkel.
- Herrn Dr. Jens Neumeier für die Hilfe bei der Erstellung der Caspaseaktivitäts-Assays.
- Den technischen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, namentlich Angelika Duttmann und Harald Boigs.

Mein besonderer Dank gilt meiner Partnerin Barbara Kannen, die mir immer wieder den nötigen Rückhalt gegeben hat um durchzuhalten. Danke das du für mich da bist! Des Weiteren danke ich meinen Eltern Willi und Erika Kühl sowie allen Freundinnen und Freunden für ihre ermutigenden Worte und Unterstützung!

---

**Lebenslauf**

---

1980	Geboren am 30.01. in Elmshorn
1999-2000	Zivildienst als Krankenpflegehelfer im Kreiskrankenhaus Elmshorn
2000-20006	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2002	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
2003	Beginn der Dissertation zum Thema „Qualitative und semi-quantitative Analyse der Proteinexpression bei Pankreas-karzinomzellen nach Stimulation des CD95-Todesrezeptors“ unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H. Kalthoff
2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005-2006	Praktisches Jahr  1. Terial: St.John's Medical College Hospital Bangalore, Indien und Orthopädische Universitätsklinik Kiel (Orthopädie)  2. Terial: Kreisklinikum Itzehoe und Sunnybrook Health Science Centre Toronto, Kanada (Chirurgie)  3. Terial: Universitätsspital Basel, Schweiz (Innere Medizin)
2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Approbation als Arzt
Seit 2007	Assistenzarzt am Universitätsklinikum Tübingen, Innere Medizin

---