

Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität
Direktor: Prof. Dr. Gabbert

**SURVIVIN UND SEINE ALTERNATIVEN SPLEISSVARIANTEN:
UNTERSUCHUNGEN ZU IHRER BEDEUTUNG FÜR EINE ZYTOSTATIKA-
INDUZIERTER APOPTOSE UND IHREN MOLEKULAREN
INTERAKTIONSPARTNERN**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Maureen Müller

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Gerharz

Korreferent: Prof. Dr. Bier

Inhaltsverzeichnis**SURVIVIN UND SEINE ALTERNATIVEN SPLEISSVARIANTEN: UNTERSUCHUNGEN ZU IHRER BEDEUTUNG FÜR EINE ZYTOSTATIKA-INDUZIERTE APOPTOSE UND IHREN MOLEKULAREN INTERAKTIONSPARTNERN**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	5
1.1 Tumoren und Apoptose	5
1.2 "Inhibitor of Apoptosis" (IAP)-Proteine	7
1.2.1 Survivin	8
1.2.2 Alternatives Spleißen von Survivin	13
1.3 Caspasen	15
1.4 Ziel dieser Arbeit	17
2 MATERIAL	18
2.1 Kulturen	18
2.1.1 Zelllinien	18
2.1.2 Escherichia coli-Stamm	18
2.2 Chemikalien	19
2.2.1 Flüssigkeiten und Feststoffe	19
2.2.2 Medien, Puffer und Lösungen	20
2.3 Nukleinsäuren	22
2.3.1 DNA-Längenstandards	22
2.3.2 Oligonukleotide	22
2.3.3 Vektoren	23
2.3.4 Plasmidkonstrukte	24
2.4 Proteine	25
2.4.1 Protein-Molekulargewichtstandards	25
2.4.2 Enzyme	25
2.4.3 Antikörper und aufgereinigte Antiseren	25
2.5 Molekularbiologische Kits	26
2.6 Hilfsmittel	27
2.6.1 Sterile Einwegartikel für Zellkulturen und Plastikgefäße	27
2.6.2 Geräte	27
2.6.3 Software und Server	27

3	METHODEN	28
3.1	Zellkultur	28
3.1.1	Kultivierung	28
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl	28
3.1.2.1	Neubauer-Zählkammer	28
3.1.2.2	MTT-Test	28
3.1.3	RNA-Extraktion	29
3.1.4	Lyse und Proteinextraktion	29
3.1.5	Hämalaun-Eosin-Färbung	29
3.1.6	Transiente Transfektion von Säugerzellen	30
3.1.6.1	Lipofektion	30
3.1.6.2	DEAE-Dextran - Methode	30
3.1.7	Bestimmung der Transfektionseffizienz	31
3.1.7.1	β -Galaktosidase-Test bei adhärennten Zellen (fest)	31
3.1.7.2	β -Galaktosidase-Test im Zellysat (flüssig)	31
3.2	Nukleinsäuren	32
3.2.1	Konzentrationsbestimmung	32
3.2.2	Elektrophoretische Auftrennung	32
3.2.2.1	Native Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.2.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.3	Aufreinigung	33
3.2.3.1	Ethanol-Fällung	33
3.2.3.2	Gelextraktion	33
3.2.3.3	Säulen-Trennverfahren	33
3.2.4	Restriktion von DNA mit Endonukleasen	33
3.2.5	Klenow-Auffüllreaktion	34
3.2.6	Ligation	34
3.2.7	Dephosphorylierung	35
3.2.8	Genspezifische Reverse Transkription (RT)	35
3.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.10	Synthese von Adenosin-Nukleotiden an DNA 5'-Enden	36
3.2.11	Sequenzierung von DNA	36
3.3	Proteine	38
3.3.1	Konzentrationsbestimmung	38
3.3.2	Western-Blot	38
3.4	Bakterien	39
3.4.1	Herstellung kompetenter E. coli zur Transformation	39
3.4.2	Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA	40
3.4.3	Extraktion von Plasmid-DNA aus E. coli	40
3.4.4	Glycerol-Stammkulturen	40
3.5	Versuchsdurchführungen	41
3.5.1	Zytostatikabehandlung Survivin-transfizierter HepG2-Zellen	41
3.5.2	CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System	44
3.5.3	Caspase-3 Aktivitätstest	47
3.5.3.1	Tubulin-Polymerisation mittels Taxol	47
3.5.3.2	Caspase-3 Aktivitätstest	47
3.5.4	Ko-Immunpräzipitation	48
3.5.5	Immunfluoreszenz	50

4	ERGEBNISSE	51
4.1	Einfluß der Survivin-Überexpression auf die Zytostatika-induzierte Apoptose	51
4.2	Caspase-3 und -7: Untersuchung zur Interaktion von Survivin und seinen Spleißvarianten in vivo	56
4.2.1	Interaktion mit Caspase-3 und -7	56
4.3	Homo- und Heterodimerisierung von Survivin und seinen Spleißvarianten in vivo	62
4.4	Caspase-3: in vitro-Interaktionspartner von Survivin?	63
4.4.1	Ko-Immunpräzipitation	63
4.4.2	Caspase-3 Aktivitätstest in vitro	63
4.5	Subzelluläre Lokalisation von Survivin nach Zytostatika-Induktion	65
5	DISKUSSION	67
5.1	Einfluß der Survivin-Expression auf die Zytostatika-induzierte Apoptose	67
5.2	Caspase-Interaktion	69
5.2.1	Caspase-Interaktion in vitro	69
5.2.2	Caspase-Interaktion in vivo	70
5.3	Dimerisation von Survivin	71
5.4	Subzelluläre Lokalisation von Survivin nach Zytostatika-Behandlung	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	74
7	LITERATURVERZEICHNIS	75

Abkürzungsverzeichnis

BIR	B aculovirus I AP R epeat
BIRCs	BIR -containing proteins
CARD	Caspase R ecruitment D omaine
CDE	cell cycle d ependent e lements
Cdk4	Cyclin d eendent k inase 4
CHR	cell cycle h omology r egion
DFF	D N A fragmentation f actor
DEAE	D iethylaminoethyl
FADD	F as-associated d eath d omain protein
IAP	I nhibitor of A poptosis Protein
INCENP	i nnner c entromere p rotein
MAD	m ultiple a nomalous d ispersion method
MTT	3,[4,5- d imethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl t etrazolium bromide
PARP	P oly A D P R ibose P olymerase
PI	P ropidium I odid
Rb	R etinoblastom
RING	R eally I nteresting G ene
RT	R aumtemperatur
TNF α	T umornekrosefaktor α
UTR	U ntranslatierte R egion

1 Einleitung

1.1 Tumoren und Apoptose

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen steht Krebs in den Industrienationen an zweiter Stelle der Todesursachen. Mit der Zunahme des durchschnittlichen Lebensalters in der Bevölkerung wächst die Bedeutung der Krebserkrankungen, da die Inzidenz von Tumoren in den letzten Lebensdekaden exponentiell ansteigt (DePinho, 2000).

Krebs ist eine Erkrankung der Gene (Bishop, 1991). Im Umkehrschluß bedeutet dies jedoch nicht, daß aus jeder genetischen Schädigung ein Tumor resultiert. Innerhalb einer Zelle existieren verschiedene Reparatursysteme, die zu einer Elimination des veränderten Genabschnittes führen können. Ist jedoch die Schädigung zu stark, kommt es zur Einleitung von Apoptose:

Die Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, wahrt im sich entwickelnden und erwachsenen Organismus durch Elimination alternder, geschädigter oder anderweitig potentiell schädlicher Zellen die Gewebshomöostase (Vaux und Korsmeyer, 1999). Der Vorgang der Apoptose muß dabei als ein komplexes System miteinander interagierender Faktoren betrachtet werden, die den programmierten Zelltod sowohl induzieren als auch hemmen (s. Abb.1). Eine Dysregulation dieses Prozesses mit erhöhter Apoptoseresistenz ist ein gemeinsames Merkmal maligner Zellen (Reed, 1999) und erweist sich als ein signifikantes Hindernis für die erfolgreiche Chemotherapie humaner Tumoren (Rudin und Thompson, 1997). Heute werden zwei Hauptsignalwege der Apoptose unterschieden:

- *Todesrezeptor-vermittelte Apoptose:*

Die Bindung von Todesliganden, wie z.B. CD95-Liganden, an den korrespondierenden Todesrezeptor, induziert eine Rezeptoraggregation mit konsekutiver Formation todesinduzierender Signalkomplexe. Man unterscheidet bei dieser Art der Signalkaskade zwei Arten von Zellen, die einen unterschiedlichen Weg der Apoptose benutzen, sog Typ I- und Typ II-Zellen. In Typ I-Zellen rekrutiert der CD95-Rezeptorkomplex über das Adaptormolekül FADD (**F**as-**a**ssociated **d**eath **d**omain protein) Procaspase-8, die anschließend in eine aktive Caspase-8 Form gespalten wird und darüber andere Caspasen, wie z. B. Caspase-3, aktiviert. In Typ II-Zellen kommt es nur geringfügig zu einer Rezeptorkomplex-Bildung und dadurch wird auch nur wenig Procaspase-8 gespalten. Die Induktion der Apoptose erfolgt in Typ II-Zellen überwiegend über die Mitochondrien, was zu einer zeitlich verzögerten Spaltung der Procaspase-3 durch Caspase-9 führt (Scaffidi et al., 1998).

- *Mitochondrialer Signalweg der Apoptose:*

Als Antwort auf stressinduzierte Signale, wie etwa durch Zytostatika, Wachstumsfaktormangel oder DNA-Schädigung, aber auch nach Rezeptoraktivierung wie z. B. CD95 in Typ II-Zellen (s.o.), kommt es u.a. zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien. Eine anschließende Komplexbildung mit Apaf-1 und Procaspase-9 führt zur Aktivierung der Caspase-9. Dieser Weg kann durch IAPs, wie z.B. Survivin, XIAP oder anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, gehemmt werden.

Außerdem kann es zur Freisetzung von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien kommen, welches einen hemmenden Effekt auf die Familie der IAPs („Inhibitors of Apoptosis“-Proteine) hat.

Diese beiden Wege der Apoptoseinduktion - direkt über Todesrezeptoren und indirekt über die Aktivierung eines mitochondrialen Signalweges - dürfen jedoch nicht getrennt betrachtet werden, da zahlreiche Möglichkeiten einer Wechselwirkung bestehen. Beispielsweise können Zytostatika sowohl über eine Hochregulation der Todesrezeptoren als auch über andere Mechanismen innerhalb der Zelle wirken (Fulda et al., 1998). Beide Wege münden in die Aktivierung von Effektor-Caspasen, die für Stabilität und Funktion der Zelle wichtige Proteine spalten.

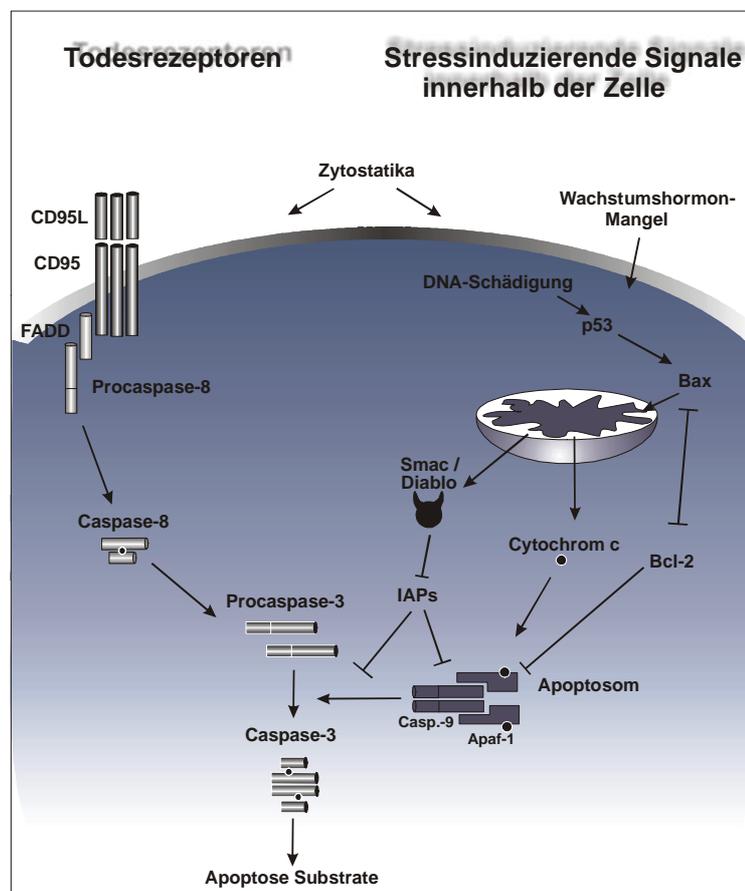


Abb. 1 Signalwege der Apoptose

1.2 “Inhibitor of Apoptosis” (IAP)-Proteine

Proteine der “Inhibitor of Apoptosis“-Familie sind Moleküle, die auf unterschiedliche Weise in die Regulation der Apoptose eingreifen. 1993 wurden im Genom von Baculoviren erstmals IAP-kodierende Sequenzen entdeckt (Birnbaum et al., 1994; Crook et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß IAPs an der Unterdrückung des Zelltodes von Baculovirus-infizierten Wirtszellen beteiligt sind. Inzwischen wurden viele weitere IAP-Vertreter in unterschiedlichen Spezies gefunden (s. Abb.2). Allen gemeinsam ist das Vorhandensein von mindestens einer BIR (= **B**aculovirus **I**AP **r**epeat) – Domäne. Dabei handelt es sich um hochkonservierte Regionen von etwa 70 Aminosäuren, die für die Hemmung der Apoptose verantwortlich sind. Das kleinste Mitglied dieser Familie ist Survivin. Da sich in der Folge jedoch herausstellte, daß nicht jedes dieser Familienmitglieder eine anti-apoptotische Funktion besitzt, wurde 2001 von Silke et al. eine neue Klassifikation dieser Proteine vorgeschlagen: Danach umfaßt die Gruppe der BIRCs (**BIR**-containing proteins) einerseits Apoptose-Inhibitoren mit Bindung an Caspasen (früher als IAPs bezeichnet) und andererseits Proteine, die für die Chromosomentrennung und Zytokinese von Bedeutung sind. Survivin wurde in dieser Klassifikation der Proteingruppe zugeordnet, die in der Mitoseregulation eine Rolle spielt (Silke und Vaux, 2001). So wird auch deutlich, daß Survivin an verschiedenen Orten in der Zelle wirkt (Altieri et al., 1999).

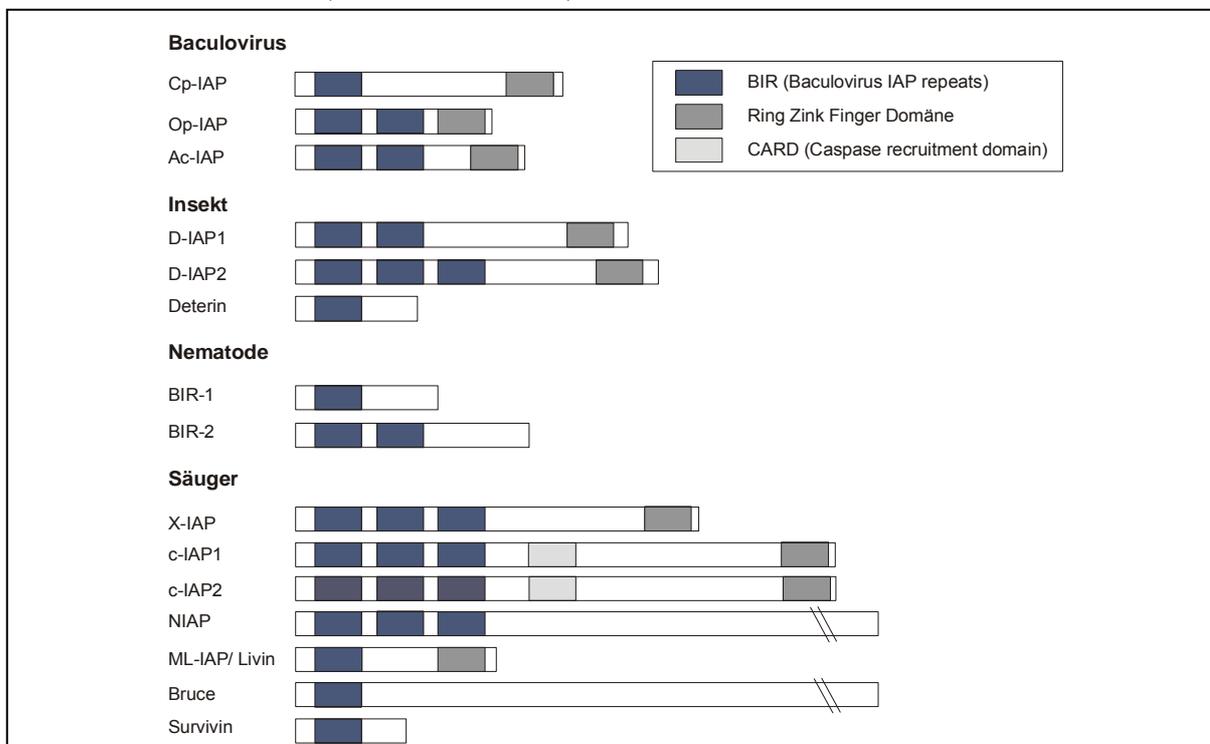


Abb.2 “Inhibitor of apoptosis”- Proteine

In verschiedenen Spezies vorkommende IAPs mit ihren charakteristischen konservierten Regionen

1.2.1 Survivin

Survivin wurde von Ambrosini et al. beim Hybridisations-Screening einer humanen P1-Genombibliothek mit cDNA von EPR-1 entdeckt und ist seither Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Ambrosini et al., 1997).

Schon durch seine Struktur (s. Abb. 2 und 3) hebt sich Survivin von den anderen IAPs ab:

- Vorhandensein von nur einer BIR - Domäne
- keine CARD (= caspase recruitment domain) – Domäne
- keine RING (= really interesting gene) – Domäne
- kleinstes IAP (16,5 kD)

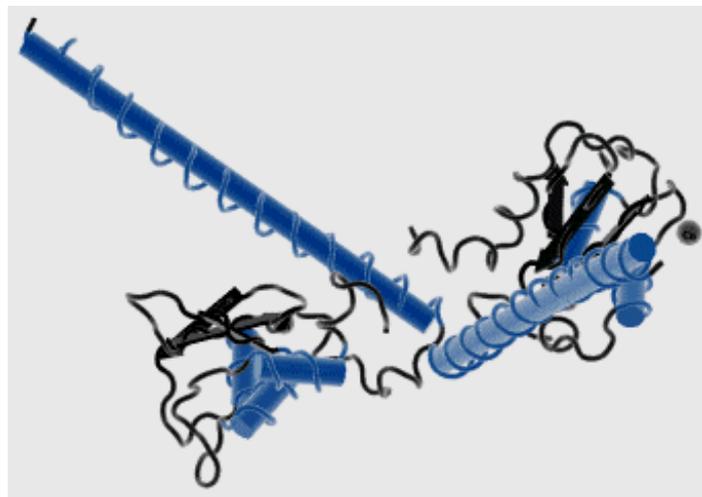


Abb. 3 Survivin-Dimer

Dreidimensionale Darstellung des Survivin-Proteins aus der ncbi-Datenbank. Das Survivin-Protein ist ein "bow tie-shaped" Dimer. Von N- nach C-terminal besteht ein Survivin-Monomer aus: einer BIR-Domäne, die drei α -Helices und ein dreisträngiges β -Faltblatt bildet (größtenteils wird die Form der Domäne durch den Zink-Finger mit vier Zink-Liganden) stabilisiert, einer Linker-Region und einer α -Helix als coiled-coil. Die Dimer-Formation kommt über Wasserstoffbrückenbindung und van der Waals-Kräfte zwischen dem N-terminalen Ende, der Linker-Region und dem N-Terminus der vierten α -Helix beider Proteine zustande (Chantalat et al., 2000)

Bedeutung von Survivin für die Onkologie

Hier sind vor allem fünf Aspekte von Bedeutung:

- *Erhöhte Expression in Tumoren*

Survivin wird während der Embryonalentwicklung exprimiert, ist jedoch in den meisten normalen, nicht proliferierenden, adulten Geweben – mit Ausnahme von Thymus und Plazenta – mittels Northern-Blot-Analysen nicht detektierbar (Ambrosini et al., 1997). Es scheint jedoch eine Kopplung zwischen Zellproliferation und der Expression von Survivin zu bestehen, da Survivin auch in einigen stark proliferierenden, nicht-neoplastischen Geweben

nachweisbar ist (Gianani et al., 2001; Konno et al., 2000). Die Survivin-Expression ist dagegen in humanen Tumoren auf das 14-Fache erhöht (Velculescu et al., 1999) und konnte in nahezu allen bislang untersuchten menschlichen Tumoren nachgewiesen werden (Adida et al., 2000a; Adida et al., 2000b; Chiodino et al., 1999; Choi et al., 2001; Grossman et al., 1999a; Grossman et al., 1999b; Grossman et al., 2001; Islam et al., 2000; Ito et al., 2000; Jaattela, 1999; Kamihira et al., 2001; Kato et al., 2001; Kawasaki et al., 2001; Lo et al., 2001; Miller et al., 2001; Monzo et al., 1999; Moore, 2001; Mori et al., 2001; Moriai et al., 2001; Sarela et al., 2000; Satoh et al., 2001; Smith et al., 2001; Swana et al., 1999; Tanaka et al., 2000; Yoshida et al., 2001).

- *Inhibition der Apoptose*

Survivin bewirkt eine Hemmung der Apoptose und bietet so Survivin-exprimierenden Tumorzellen einen unmittelbaren Selektionsvorteil: So bindet Survivin an die aktiven Formen der *Caspase-3 und -7* und verhindert zudem eine Umwandlung der entsprechenden Procaspasen in ihre aktiven Formen (Tamm et al., 1998). Eine Survivin-induzierte Inhibition der Apoptose wurde außerdem über eine indirekte Caspase-Hemmung beschrieben: Hier wurde die an der Zellzyklus-Regulation beteiligte Kinase *Cdk4* als Bindungspartner von Survivin identifiziert. Durch eine kompetitive Interaktion von Survivin mit dem Cdk4-p21-Komplex wird p21 freigesetzt. P21 bindet an mitochondriale Procaspase-3 und verhindert deren Aktivierung zu Caspase-3 (Suzuki et al., 2000b) (s. Abb. 4). Eine Interaktion mit *Mikrotubuli* wurde von Li et al. nachgewiesen: Zu Beginn der Mitose assoziiert Survivin mit Mikrotubuli der Mitosespindel. Eine Unterbrechung dieser Survivin-Mikrotubuli-Interaktionen führt zu einem Verlust der anti-apoptotischen Funktion von Survivin und einem Anstieg der Caspase-3 Aktivität (Li et al., 1998). Auch eine Assoziation mit *p34 cdc2* mit nachfolgender Phosphorylierung von Survivin scheint für eine Hemmung der Caspase-9 durch Survivin von Bedeutung zu sein (O'Connor et al., 2000a).

- *Zellzyklus-regulierte Expression*

Die Survivin-Expression erfolgt vorwiegend in der G2/M-Phase des Zellzyklus, während es in der G1-Phase zu einer Expressionsreduktion kommt (Li et al., 1998). Promotoranalysen unterstützen diese Feststellung durch das Vorhandensein der Zellzyklus-abhängigen Sequenzabschnitte CDE (= cell cycle dependent elements) und CHR (= cell cycle homology region) (Li und Altieri, 1999).

- *Zellzyklus-Regulation*

Survivin initiiert außerdem den Eintritt in den Zellzyklus: Nach Translokation in den Zellkern kommt es zu einer Interaktion von Survivin und *Cdk4*. Es folgt eine Aktivierung des

Cdk2/CyclinE-Komplexes, der eine Rb-Phosphorylierung induziert und so den Zellzyklus aus dem G1-Arrest in die S-Phase überführt (Suzuki et al., 2000a) (s. Abb. 4). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, daß Survivin auch als „chromosomal passenger protein“ agiert, d.h. während der Mitose von den Zentromeren zur Spindelmittelzone transloziert wird (Adams et al., 2001; Skoufias et al., 2000; Wheatley et al., 2001). In einem Komplex mit *INCENP* (=inner centromere protein) und der *Aurora-B Kinase* ist Survivin wichtig für den Ablauf der Mitose mit Chromosomenkondensation und -trennung, sowie für die abschließende Zytokinese (s.u.) (Adams et al., 2001; Wheatley et al., 2001).

- *Zytokinese-Regulation*

Auch in der Zytokinese spielt Survivin eine wichtige Rolle: Eine Unterbindung der Funktion von Survivin verursacht Zellteilungsdefekte, die durch multipolare, mitotische Spindeln und multinukleäre, polyploide Zellen gekennzeichnet sind (Li et al., 1999).

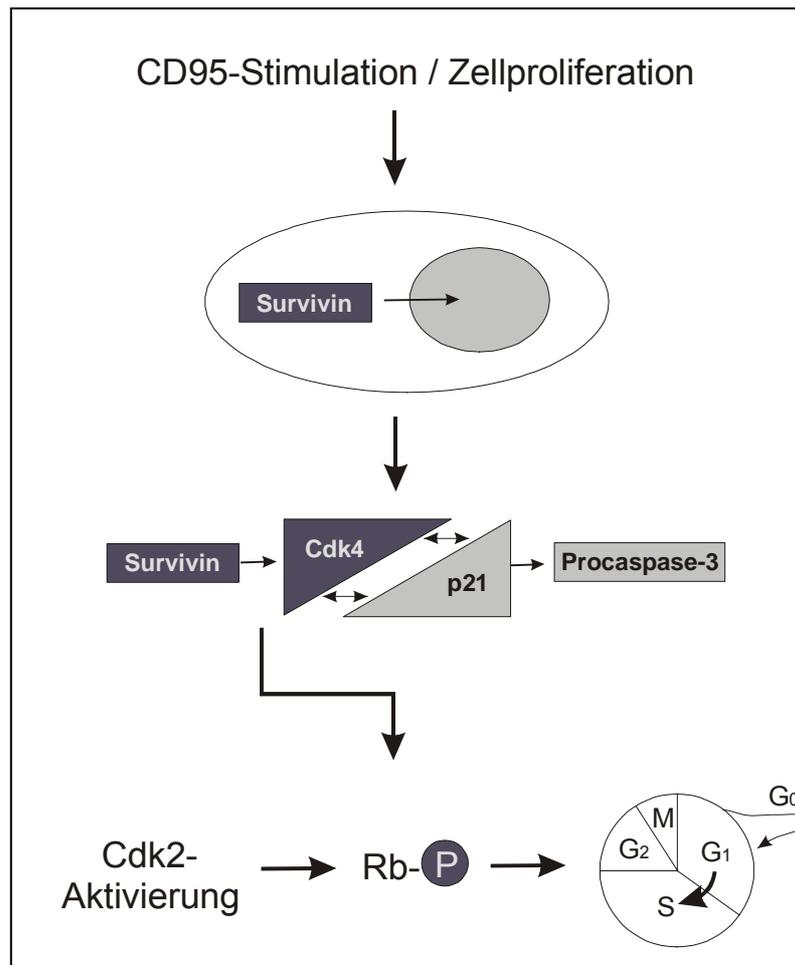


Abb. 4 Interaktion von Survivin mit Cdk4

Nach einer Stimulation des CD95-Rezeptors transloziert Survivin in den Zellkern und interagiert dort mit dem Zellzyklus-Regulator Cdk4. Als Folge der Survivin/Cdk4-Komplex-Bildung wird p21 aus seinem Komplex mit Cdk4 freigesetzt. P21 interagiert mit der Procaspase-3 und kann den CD95-vermittelten Zelltod unterdrücken. Die Bindung von Survivin an Cdk4 führt zur Cdk2/CyclinE-Aktivierung und Rb-Phosphorylierung, wodurch die Zelle von der G1- in die S-Phase wechselt.

Einen zusammenfassenden Überblick über die Wirkungen von Survivin an der Nahtstelle zwischen Apoptose- und Zellzyklusregulation gibt Abb.5:

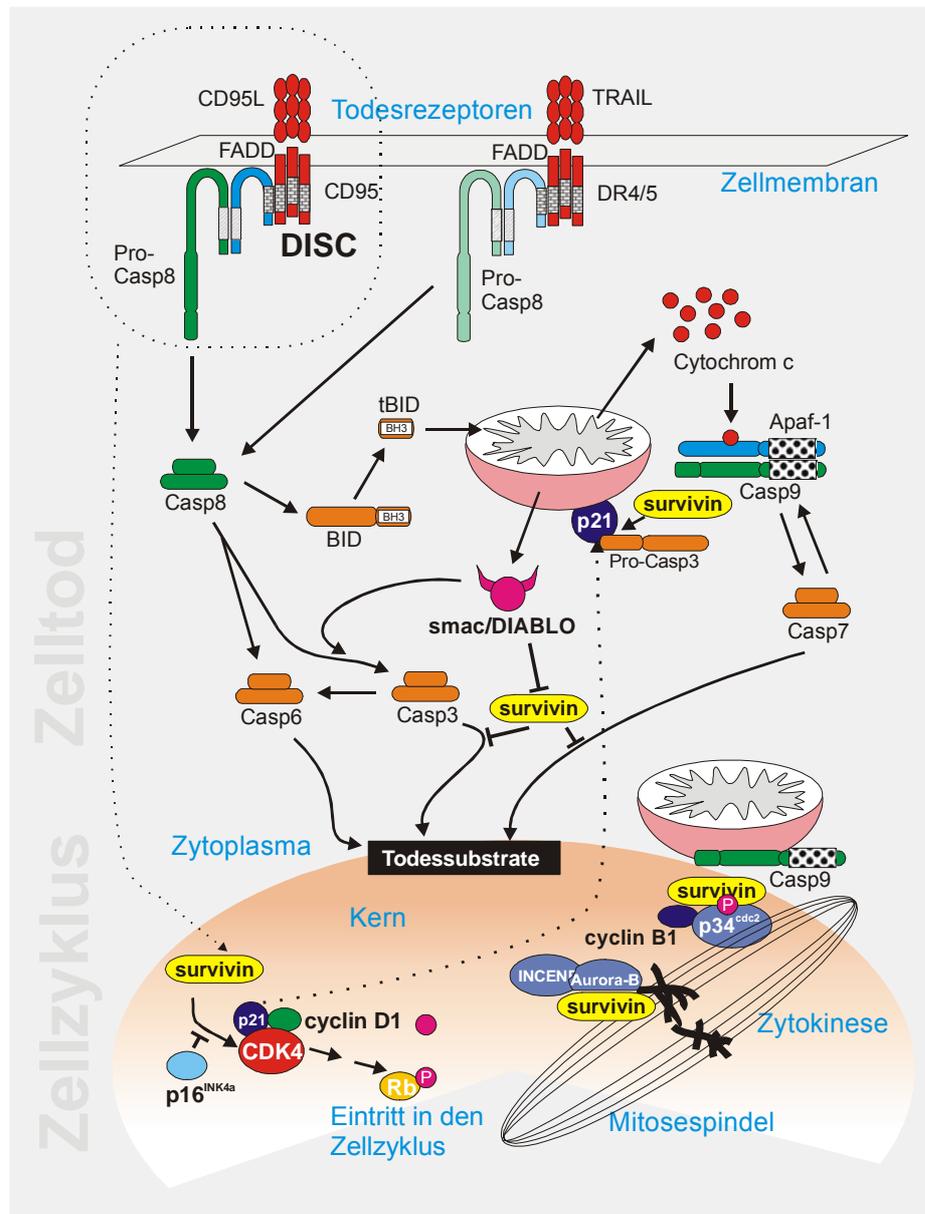


Abb. 5 Aktionen von Survivin an der Nahtstelle zwischen Apoptose und Zellzyklusregulation

Über eine Bindung der Liganden TRAIL und CD95L an die Todesrezeptoren CD95 bzw. DR4/5 wird eine Spaltung der Procaspase-8 zu ihrer aktiven Form induziert. Diese führt zum einen zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges, zum anderen zu einer Aktivierung der downstream-Caspasen-3 und -6. In den Mitochondrien kommt es so zu einer Freisetzung sowohl von Cytochrom c mit nachfolgender Caspase-9 und -7 Aktivierung als auch von smac/DIABLO, einem Survivin-Inhibitor und Caspase-3-Aktivator. Am Ende der Apoptose-Kaskade steht die Spaltung Caspase-spezifischer Proteine, die für die Stabilität und Funktion der Zelle von Bedeutung sind. Survivin greift sowohl in Apoptosewege als auch in den Zellzyklus ein: Induktion der Procaspase-3/p21 Komplexbildung nach Interaktion von Survivin mit Cdk4 (Suzuki et al., 2000b); Hemmung der aktiven Caspasen-3 und -7 (Tamm et al., 1998) (Shin et al., 2001); Assoziation mit p34 an der Mitosespindel und Phosphorylierung von Survivin (O'Connor et al., 2000a); Bindung an Cdk4, das über eine Phosphorylierung des Rb-Proteins zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus führt (Suzuki et al., 2000a); Bindung an Mikrotubuli der Mitosespindel und Beeinflussung der Zytokinese (Li et al., 1998); Survivin als „chromosomal passenger protein“ mit Bindung an die Aurora-B Kinase und INCENP (Li et al., 1999)

Die bislang vorliegenden Kenntnisse über die molekularen Wirkmechanismen von Survivin könnten in Zukunft auch für die Diagnose, Prognose und Therapie von Tumoren an Bedeutung gewinnen:

- *Diagnose*

Die vermehrte Expression von Survivin in Tumoren könnte diagnostisch genutzt werden: So gelang bei Lungen- und Kolorektalkarzinompatienten ein Survivin-Antikörper-Nachweis im Serum (Rohayem et al., 2000). Außerdem zeigten Smith et al. (2001) und Sharp et al. (2002) die Möglichkeit einer Survivin-Detektion im Urin von Blasenkarzinompatienten.

- *Prognose*

Die Survivin-Expression erwies sich bei verschiedensten Tumoren als Prognosefaktor, z.B. bei B-Zell-Lymphomen (Adida et al., 2000b), Magenkarzinomen (Okada et al., 2001), Neuroblastomen (Islam et al., 2000; Tajiri et al., 2001; Sandler et al., 2002), Kolorektalkarzinomen (Sarela et al., 2000; Sarela et al., 2001), Mammakarzinomen (Tanaka et al., 2000), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Monzo et al., 1999), Blasenkarzinomen (Swana et al., 1999), Oesophaguskarzinomen (Kato et al., 2001), Hepatozellulären Karzinomen (Ikeguchi et al., 2002), Plattenepithelkarzinomen (Lo et al., 2001), Gliomen (Chakravarti et al., 2002), Weichteilsarkomen (Kappler et al., 2001; Wurl et al., 2002) und bei verschiedenen Nierentumoren (Takamizawa et al., 2001).

- *Therapie*

Die Funktionen von Survivin eröffnen möglicherweise auch neue Angriffspunkte in der Therapie von Tumoren. So konnte durch *Unterdrückung der Survivin-Aktion* mittels einer dominant-negativen Mutante (Grossman et al., 2001; Kanwar et al., 2001) oder den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden (Chen et al., 2000; Kanwar et al., 2001) eine vermehrte Apoptose und damit Wachstumshemmung von Tumoren erreicht werden. Survivin könnte auch ein möglicher Angriffspunkt in der *Anti-Angiogenese-Therapie* werden: Von O'Connor et al. (2000) wurde während der Angiogenese in Endothelzellen eine Apoptosehemmung durch eine vermehrte Survivin-Expression beschrieben (O'Connor et al., 2000b). Papapetropoulos et al. (2000) zeigten, daß Angiopoetin-1 über eine Phosphorylierung der Serin-Threonin-Kinase Akt und konsekutive Hochregulation der Survivin-Expression die Apoptose in Gefäßendothelzellen hemmt (Papapetropoulos et al., 2000). Außerdem wurde eine Induktion von Survivin in Gefäßendothelzellen nach VEGF-Stimulation (= vascular endothelial growth factor) (Tran et al., 1999) und eine Unterdrückung der VEGF-vermittelten Endothelzell-Protektion nach Survivin-Inaktivierung (Mesri et al., 2001; Tran et al., 2002)

beschrieben. Darüber hinaus konnten bei Tumorpatienten Survivin-erkennende, zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Andersen et al., 2001).

1.2.2 Alternatives Spleißen von Survivin

Das Spleißen der Transkripte eukaryoter Gene läßt im Sinne einer erhöhten Variabilität unterschiedliche mRNA-Transkripte und damit auch unterschiedliche Proteine entstehen. Dieses alternative Spleißen spielt auch eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod. So entstehen aus in der Apoptose involvierten Genen unterschiedliche Proteine mit z.T. sogar gegensätzlicher Funktion. Über den Weg des alternativen Spleißens ist somit zusätzlich eine Möglichkeit der Regulation des programmierten Zelltodes gegeben (Jiang und Wu, 1999).

1999 wurden mittels RT-PCR zwei alternative Spleißvarianten des Survivins in humanen Nierenzell-Karzinom Zelllinien entdeckt (Mahotka et al., 1999):

Survivin-ΔEx3 (s. Abb. 6 und 7): Durch das fehlende Exon 3 kommt es zu einer Modifikation der BIR-Domäne mit nachfolgender Verschiebung des Leserasters in Exon 4. Als Konsequenz endet der offene Leserahmen von *Survivin-ΔEx3* in der 3`untranslatierten Region von Survivin, und es entsteht ein neues COOH-terminales Ende mit einem nukleären Lokalisationssignal (=NLS). Die Zinkfinger-Domäne bleibt hier nicht erhalten.

Survivin-2B (s. Abb. 6 und 7): Über eine Insertion von Exon 2B findet eine Modifikation der BIR-Domäne statt ohne Veränderung des Leserasters.

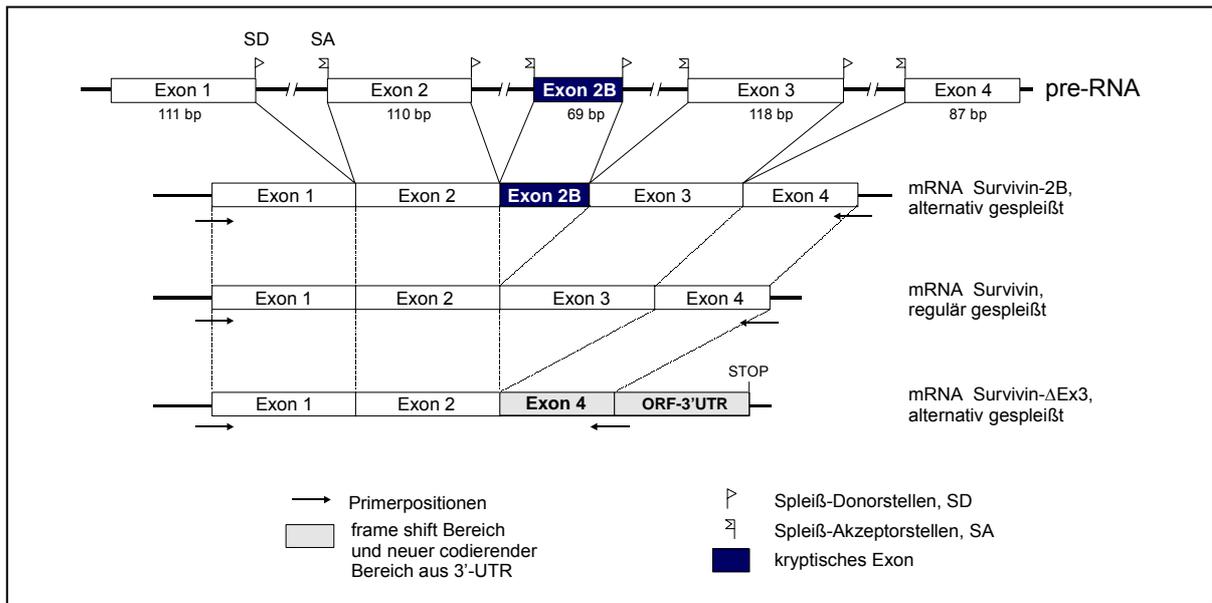


Abb. 6 Nukleinsäuren: Alternatives Spleißen der Survivin-prä-mRNA

Durch alternatives Spleißen der Prä-mRNA von Survivin an bestimmten Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptorstellen entstehen die reife mRNA von Survivin-2B, Survivin und Survivin-ΔEx3. Im Fall von Survivin-2B kommt es zu einer Insertion eines zusätzlichen Exons zwischen Exon 2 und 3 (Exon 2B), wobei das Leseraster erhalten bleibt. Bei Survivin-ΔEx3 fehlt Exon 3, und durch den dadurch bedingten Leserasterverschub wird ein neuer kodierender Abschnitt aus der 3`untranslatierten Region (UTR) bis zum neuen Stop-Codon angefügt.

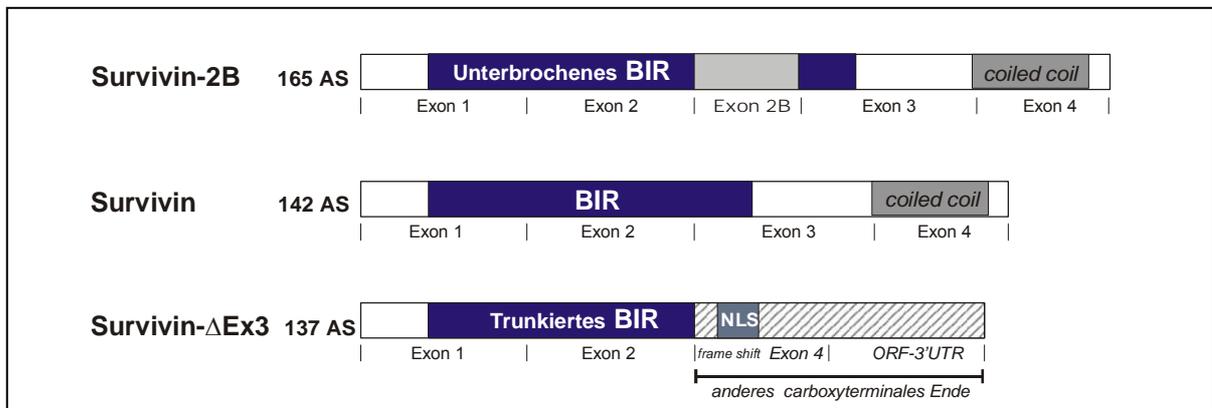


Abb. 7 Proteine: Strukturmodule von Survivin und seinen alternativen Spleißvarianten

Das Survivin-Monomer besteht aus einer BIR-Domäne, einer Linker-Region und einer C-terminalen α -Helix als coiled-coil. Sowohl bei Survivin-ΔEx3 als auch bei Survivin-2B kommt es durch die Insertion bzw. das Fehlen eines Exons zu einer Veränderung der BIR-Domäne. Aufgrund der Leserasterverschiebung weist Survivin-ΔEx3 zusätzlich ein anderes carboxyterminales Ende und ein nukleäres Lokalisationssignal (=NLS) auf.

Über den Wirkmechanismus dieser alternativen Spleißvarianten von Survivin ist noch wenig bekannt. Erste Hinweise lieferten Methotrexat-Behandlungen Survivin-transfizierter HepG2-Zellen, in denen sich ein unterschiedliches anti-apoptotisches Verhalten der Spleißvarianten herausstellte (Mahotka et al., 1999).

1.3 Caspasen

Caspasen sind Cysteinproteasen, die für die Exekution der Apoptose verantwortlich sind. Sie werden über die Signalkaskade der Apoptose aktiviert und spalten Aspartat-spezifisch Proteine, die für Stabilität und Funktion der Zelle von Bedeutung sind. Derzeit sind 14 Caspasen bei Säugern identifiziert, die sich durch ihre charakteristische Struktur auszeichnen. Von N- nach C-terminal enthalten Caspasen mehrere Domänen, die in Tab. 1 aufgelistet sind:

STRUKTURDOMÄNEN DER CASPASEN	
Domänen und Untereinheiten	Funktion / Charakteristika
Prodomäne	variabel in Sequenz und Länge; enthält möglicherweise Informationen für Reifung und subzelluläre Lokalisation
Große Untereinheit (p20)	Bestandteil des aktiven Enzyms von ~20 kDa
Linker-Region	nicht bei allen Caspasen vorhanden; unbekannte Funktion
Kleine Untereinheit (p10)	Bestandteil des aktiven Enzyms von ~10 kDa

Tab. 1

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt über eine Spaltung in ihre große und kleine Untereinheit. Es existieren verschiedene Mechanismen, die zu einer Aktivierung führen. Von Hengartner et al. (2000) werden die folgenden Aktivierungsmechanismen abgegrenzt:

Zum einen spalten sogenannte *upstream-Caspasen* sogenannte Effektor-Caspasen in ihre aktiven Einheiten. Ebenso kann die Aktivierung über eine sogenannte *induzierte Nähe* bewirkt werden: Nach Ligandenbindung an Todesrezeptoren, wie z.B. CD95, kommt es zur Bildung von Signalkomplexen. Diese rekrutieren mehrere Moleküle Procaspase-8, deren geringe intrinsische Proteaseaktivität in diesem Signalkomplex für eine gegenseitige Spaltung und Aktivierung ausreicht. Die *Assoziation mit einer regulatorischen Untereinheit* wurde bei der Caspase-9 als Aktivierungsmechanismus beschrieben: So führt die Bildung des Apoptosomenkomplexes, bestehend aus Apaf-1, Cytochrom c und Procaspase-9, zur Aktivierung der Caspase (Hengartner, 2000).

Nach der Spaltung lagern sich große und kleine Untereinheiten der Procaspase zu einem Heterodimer zusammen (s. Abb. 8), bei einigen Caspasen zusätzlich zwei Heterodimere zu einem Tetramer.

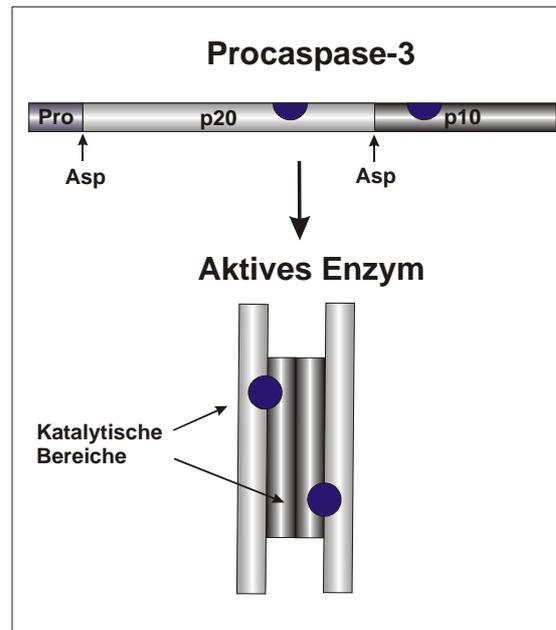


Abb. 8 Caspase-Aktivierung

Am Beispiel von Caspase-3 dargestellte Prozessierung der Caspasen von ihrer Proform zu ihrer aktiven Form. Nach Aspartat-spezifischer Spaltung lagern sich die große (p20) und kleine (p10) Untereinheit zusammen, so daß katalytisch aktive Bereiche entstehen.

Man kann Caspasen in up- und downstream-Caspasen unterteilen:

Upstream-Caspasen, wie z.B. Caspase-8, werden über Signalkomplexe der Apoptose aktiviert und bewirken in der Caspase-Kaskade eine Spaltung anderer Caspasen.

Downstream-Caspasen, wie z.B. Caspase-3 und -7, inaktivieren als Effektor-Caspasen Proteine, die vor Apoptose schützen, wie z.B. PARP (DNA-Reparatur, Hemmung der Endonuklease), Bcl-2 oder Rb, oder zerstören Zellstrukturen wie Lamin, Fodrin, U1-70kDa, Actin und Topoisomerase I und II. Auf diese Weise kommt es zur charakteristischen apoptotischen Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Kernsegmentation und Formation von apoptotischen Körperchen.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Rolle von Survivin und seinen alternativen Spleißvarianten bei der Zytostatika-induzierten Apoptose. Hierbei wurde mehreren Fragekomplexen nachgegangen:

- Als ein in Tumoren überexprimiertes Apoptose-inhibierendes Protein könnte Survivin und seinen Spleißvarianten eine besondere Bedeutung für die Zytostatika-Resistenz maligner Tumoren zukommen. In Überexpressionsmodellen sollte deshalb zunächst untersucht werden, ob bestimmte Zytostatika in der Lage sind, den zytoprotektiven Effekt von Survivin aufzuheben. Vergleichend sollte in Überexpressionsmodellen der Einfluß der alternativen Survivin-Spleißvarianten auf den Zytostatika-induzierten Zelltod überprüft werden.
- Da die Caspase-inhibierende Wirkung von Survivin in der Literatur noch kontrovers diskutiert wird, haben wir untersucht, ob Survivin und seine alternativen Spleißvarianten direkt mit den Effektor-Caspasen -3 und -7 interagieren können.
- Da Survivin wahrscheinlich als Dimer aktiv wird, sind wir der Frage nachgegangen, ob eine Homo- bzw. eine Heterodimerisation der verschiedenen Survivin-Spleißvarianten nachweisbar ist.
- Da die molekularen Interaktionspartner von Survivin und seinen Spleißvarianten auch von ihrer subzellulären Lokalisation determiniert sind, haben wir untersucht, ob Zytostatika das differentielle subzelluläre Verteilungsmuster der verschiedenen Survivin-Varianten modifizieren.

2 Material

2.1 Kulturen

2.1.1 Zelllinien

ZELLINIEN		
Zellinie	Charakterisierung	Medium
HepG2	humane Hepatoblastom-Zelllinie	RPMI
COS-7	von der afrikanischen grünen Meerkatze stammende Nieren-Zelllinie, SV40 transformiert	DMEM
Jurkat J16	humane T-ALL Zelllinie	RPMI

Tab. 2

Die Zelllinien wurden in Medien unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 60 U/ml Penicillin/Streptomycin und 2mM L-Glutamin bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂ (v/v) kultiviert.

2.1.2 Escherichia coli-Stamm

XL1-Blue F[']: Tn10 proA⁺B⁺ lac^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (NaI^r) thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 lac

2.2 Chemikalien

2.2.1 Flüssigkeiten und Feststoffe

CHEMIKALIEN	
Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid	Biozym, Hess. Oldenburg
Agar	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumpersulfat	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Chloroquin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Colchicin	Calbiochem, Schwalbach
DEAE-Dextran	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DEPC	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
D-Glukose	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
DTT	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
EDTA (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	ROTH, Karlsruhe
Etoposid	Calbiochem, Schwalbach
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Boehringer, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Milchpulver	BIO-RAD, München
Mounting-Medium	Biomol
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran (Optitran)	Schleicher & Schuell, Dassel
PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Pepton	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Protein G	Pharmacia Biotech, Freiburg
Random-Primer	Stratagene, La Jolla, Kalifornien
Salzsäure, rauchend	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
SDS	ROTH, Karlsruhe
Topotecan (Hycamtin®)	Smith Kline Beecham, München
Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin
Tubulin bovine	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasser, HPLC-Qualität	ROTH, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt

Tab. 3

2.2.2 Medien, Puffer und Lösungen

MEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN		
Substrate	Herstellung	
Ampicillin (D[-]α-Aminobenzylpenicillin)	50 mg/ml in Aqua dest.	
2X Puffer	200 mM	Natriumphosphat-Puffer, pH 7,3
	2 mM	MgCl ₂
	100 mM	β-Mercapto-Ethanol
	1,33 mg/ml	ONPG
Caspase-3 Assay Puffer	100 mM	NaCl
	50 mM	Hepes
	10 mM	DTT
	1 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerol
	0,1 % (v/v)	CHAPS
	pH 7,4	
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v)	Diethylpyrocarbonat
	ad	Aqua dest.
EDTA-Lösung	0,05 % (w/v)	EDTA
	ad	PBS
Substrat des β-Galaktosidase-Tests	1,22 ml	40mM X-Gal (in DMSO)
	1 ml	100mM K ₄ Fe(CN) ₆
	1 ml	100 mM K ₃ Fe(CN) ₆
	40µl	1 M MgCl ₂
	Aqua dest. ad 20 ml	
Fixierreagenz für Zellen	2% (v/v)	Formaldehyd
	0,2% (v/v)	Glutaraldehyd
	in Aqua dest.	
Kanamycin	10 mg/ml in Aqua dest.	
Ladepuffer für Agarosegele (6X)	125 mM	Tris pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	10 % (v/v)	Glycerol
LB-Agarplatten	10 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	1 ml	5 M NaOH
	16 g	Agar
	100 µg/ml	Ampicillin (optional)
	Aqua dest. ad 1l	
Luria-Bertani-Medium (LB, pH 7,5)	10 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	1 ml	5 M NaOH
	Aqua dest. ad 1l	
Lysepuffer für die IP	50 mM	Tris pH 7,5
	15 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Triton X-100

	vor Gebrauch hinzufügen:	
	1X	Protease-Inhibitor-Mix (1:1000)
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF (250 mM in 95% EtOH)
MOPS-Puffer (20X)	0,4 M	MOPS
	160 mM	Natriumacetat
	20 mM	EDTA (pH 8,0)
Ponceaurot-Färbelösung	0,2% (w/v)	Ponceaurot
	in 5% Essigsäure	
Protease-Inhibitor-Mix (1000X)	5 mg	Chymostatin
	5 mg	Pepstatin A
	5 mg	Leupeptin
	5 mg	Antipain
	DMSO ad 1 ml	
Protein-Lysepuffer	0,1 M	Natriumchlorid
	0,01 M	Tris-HCL (pH7,6)
	0,001 M	EDTA (pH 8,0)
	1% (v/v)	Nonidet P40
SDS-Gelladepuffer (2X)	125 mM	Tris pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	10 % (v/v)	Glycerol
	10 % (v/v)	β-Mercapto-Ethanol
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
SOB-Medium, pH7,0	2% (w/v)	Pepton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	0,05% (w/v)	NaCl
	25 mM	KCl
SOC-Medium	2% (w/v)	Pepton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	0,05% (w/v)	NaCl
	25 mM	KCl
	20 mM	Glukose
SSC (20X, pH 7,0)	0,3 M	Natriumcitrat
	3 M	Natriumchlorid
TBE (5X)	54 g	Tris
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	Aqua dest. ad 1l	
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	0,1 mM	EDTA, pH 8,0
TFBI (pH 5,8)	100 mM	Rubidiumchlorid
	50 mM	Manganchlorid
	10 mM	Calciumchlorid
	30 mM	Kaliumacetat
	15 % (v/v)	Glycerol
TFBII (pH 6,8)	10 mM	Rubidiumchlorid
	75 mM	Calciumchlorid
	10 mM	MOPS
	15 % (v/v)	Glycerol

Trypsin-EDTA-Lösung	10 ml 5 ml 85 ml	Trypsin (10X) EDTA (1%) PBS
Western-Blot-Blockingpuffer	2 % (w/v) 4 % (w/v) ad	BSA Milchpulver PBS
Western-Blot-Elektrophoresepuffer (1X)	3,5 mM 25 mM 192 mM	SDS Tris Glycin
Western-Blot-Transferpuffer, pH 8,3	25 mM 192 mM 20% (v/v) in Aqua dest.	Tris-Cl Glycin Methanol
Western-Blot-Waschpuffer	10 mM 150 mM 0,2% (v/v)	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl Tween 20
X-Gal-Stammlösung für Agarplatten (1000X)	20 mg/ml	X-Gal in N,N-Dimethylformamid

Tab. 4

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 DNA-Längenstandards

DNA-LÄNGENSTANDARDS		
Name	Bezugsquelle	Fragmentlängen [bp]
1kb DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein	75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216; 1 µg/µl
100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072,; 1 µg/µl

Tab. 5

2.3.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden als HPLC-gereinigte Lyophilisate von verschiedenen Herstellern bezogen.

OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEQUENZIERUNG	
Name	Sequenz (5' → 3')
EGFP-N	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T3	ATTAACCCTCACTAAAG
VP16	GACATGTTGGGGGACGGGGATTC
GAL4	GAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGA

Tab. 6

OLIGONUKLEOTIDE FÜR RT-PCR		
Gen / GenBank Zugriffsnr.	Sequenz (5' → 3')	Position
Caspase-3 (U13737)	CATT GGATCC GGTATCCATGGAGAACACTG	218 – 237
	AAAAT CTAGACCA ACCAACCATTCTTTAG	1055-1074
- P20 Untereinheit	TGG GGATCC CTGAGATGGGTTTATGTAT	349 – 367
	ACAT CTAGATT CTGTACCACGGCAGGCCTGAAT	725 - 692
- P10 Untereinheit	ATGG GATCCT GGCGTGTCAAAAATACCAG	769 – 789
	ATTT CTAGAGT GATAAAAATAGAGTTC	1038 - 1055
Caspase-7 (U37448)	CGCC GGATCC CGCGTGGGAACGATGGCAGATG	32 – 53
	CTAG TCTAGACCC CTGATATGGCTATTGACTG	946 – 967
- P20 Untereinheit	TG AGGATCC AAAAGCTGGGCAAATGCATC	237 – 257
	AT TCTAGACT CGGTCCCTCGGCAAG	597 - 613
- P10 Untereinheit	C AGGGATCC ATCCTCGATAACAAGATCCCAG	666 – 686
	ATAT CTAGATT GACTGAAGTAGAGTTCCTT	932 - 952
GAPDH (J04038, PCR- Kontrolle)	ACGGATTTGGTCGTATTGGGCG	59 – 80
	CTCCTGGAAGATGGTGATGG	251 - 270
Fett: Restriktionsschnittstellen für BamHI bzw. XbaI		

Tab. 7

2.3.3 Vektoren

VEKTOREN	
Vektor	Bezugsquelle
pCMVB	Clontech, Heidelberg
pEGFP-N3	Clontech, Heidelberg
pcDNA3	Invitrogen, Groningen
pGEM-T	Promega, Mannheim
pACT	Promega, Mannheim
pACT-MyoD	Promega, Mannheim
pBIND	Promega, Mannheim
pBIND-Id	Promega, Mannheim
pG5-luc	Promega, Mannheim

Tab. 8

2.3.4 Plasmidkonstrukte

PLASMIDKONSTRUKTE			
Name	Vektor	Insert und GenBank Zugriffsnr.	Restriktions-schnittstellen
pSurvivin-EGFP	pEGFP-N3	Survivin cDNA, Nt 50 – 470, NM_001168	KpnI / BamHI
pSurvivin-ΔEx3-EGFP	pEGFP-N3	Survivin-ΔEx3 cDNA, Nt 50 – 636,- Exon 3, NM_001168	KpnI / BamHI
pSurvivin-2B-EGFP	pEGFP-N3	Survivin-2B cDNA, Nt 50 – 470, + 69bp Exon 2B, NM_001168	KpnI / BamHI
pSurvivin-ACT	pACT	Survivin cDNA, Nt 50 – 470, NM_001168	EcoRV
pSurvivin-ΔEx3-ACT	pACT	Survivin-ΔEx3 cDNA, Nt 50 – 636,- Exon 3, NM_001168	EcoRV
pSurvivin-2B-ACT	pACT	Survivin-2B cDNA, Nt 50 – 470, + 69bp Exon 2B, NM_001168	EcoRV
pCaspase-3-BIND	pBIND	Caspase-3 cDNA, Nt 218 – 1074, U13737	BamHI / XbaI
pCaspase-3P20-BIND	pBIND	Caspase-3 P20 Untereinheit cDNA, Nt 349 – 692, U13737	BamHI / XbaI
pCaspase-3P10-BIND	pBIND	Caspase-3 P10 Untereinheit cDNA, Nt 769 – 1055, U13737	BamHI / XbaI
pCaspase-7P20-BIND	pBIND	Caspase-7 P20 Untereinheit Nt 237 – 613, U37448	BamHI / XbaI
pCaspase-7P10-BIND	pBIND	Caspase-7 P10 Untereinheit Nt 666 – 952, U37448	BamHI / XbaI

Tab. 9

2.4 Proteine

2.4.1 Protein-Molekulargewichtstandards

PROTEIN-MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS		
Name	Bezugsquelle	Proteingrößen [kD]
Low-Range	BIO-RAD, München	6.5, 14.4, 21.5, 31.0, 45.0, 66.2, 97.4
Broad-Range	BIO-RAD, München	6.5, 14.5, 21.5, 31, 45, 66, 97.4, 116, 200

Tab. 10

2.4.2 Enzyme

ENZYME	
Enzym	Bezugsquelle
AMV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
BamHI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
CIP Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
KpnI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Large Fragment of DNA Polymerase I	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Rnasin Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Vent _R DNA Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
XbaI Endonuklease	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

Tab. 11

2.4.3 Antikörper und aufgereinigte Antiseren

PRIMÄRE ANTIKÖRPER			
Antigen	Klon / Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
humane Caspase-3	H-277	polyklonal, Kaninchen, Erkennung der p11 und p20 Untereinheit humaner Caspase-3	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
humane Caspase-7	B94-1	monoklonal, Maus, Erkennung der 35kD und 17kD Untereinheit humaner Caspase-7	Pharmingen, San Diego, Kalifornien
GAL4	DBD	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
VP16	14-5	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
GFP		monoklonal, Maus	Clontech, Heidelberg
Survivin	SURV-11A	affinitätsgereinigtes Serum, Kaninchen, Erkennung von Survivin und Survivin-2B	Alpha Diagnostics International, Köln
Ki-67	MibI	monoklonal, Maus	Dianova

Tab. 12

SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER		
Bezeichnung	Ursprungsspezies	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen Ig, Peroxidase-gekoppelt	Esel	Amersham Life Technologies, Braunschweig
Anti-Maus Ig, Peroxidase-gekoppelt	Schaf	Amersham Life Technologies, Braunschweig
Anti-Maus Ig, CIII-gekoppelt	Kaninchen	Dianova
Anti-Maus Ig, TRITC-gekoppelt	Kaninchen	Dianova
Anti-Kaninchen Ig, TRITC-gekoppelt	Kaninchen	Dianova

Tab. 13

2.5 Molekularbiologische Kits

MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS	
Name	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Big Dye Primer Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Caspase-3 Assay	Calbiochem, Bad Soden
CAT-Lysepuffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luciferase Reporter Gene Assay high sensitivity	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MicroSpin Columns S-300	Pharmacia Biotech
pGEM-T Vector System I	Promega, Mannheim
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy Midi Kit	Qiagen, Hilden

Tab. 14

2.6 Hilfsmittel

2.6.1 Sterile Einwegartikel für Zellkulturen und Plastikgefäße

Plastikartikel wurden von den Firmen Falcon (Becton-Dickinson), Eppendorf und Nunc bezogen.

2.6.2 Geräte

GERÄTE	
Gerät	Hersteller
Axioskop	Zeiss, Köln
Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc.
DM IRB Inversmikroskop	Leica
DU 640 Spektrophotometer	Beckman Instruments, München
Gelelektrophoresekammer GNA 100	Pharmacia Biotech, Freiburg
Gelelektrophoresekammer GNA 200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Genetic Analyser 310	Applied Biosystems, Weiterstadt
L8-M Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
Labovort FS	Leitz
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Hanau
Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster	Hoefer, Freiburg
Mighty Small Transfer Elektrophoresis Unit	Hoefer, Freiburg
pH-Meter 340	Beckman Instruments, München
Spectrocrosslinker XL-1000	Spectronics Corporation, Lincoln, Nebraska
β-Szintillationscounter	Beckman Instruments, München
Sterilbank	Clean Air Deutschland
T1-Thermocycler	Biometra, Göttingen
Titertek Multiskan Plus	Labsystems
Transilluminator TFX-20M	Vilber Lourmat
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich

Tab. 15

2.6.3 Software und Server

- Lasergene DNASTar
- BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- CytoVision von Applied Imaging

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung

Die Zelllinien COS-7 und HepG2 wurden in DMEM bzw. RPMI Medium mit den oben aufgeführten Zusätzen nach Standardmethoden kultiviert. Zur Passage wurden die adhärennten Zellen im Falle der COS-7-Zellen mit EDTA-, bei den HepG2-Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Auf diese Weise konnten sie in der logarithmischen Phase ihres Wachstums gehalten werden.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

3.1.2.1 Neubauer-Zählkammer

Durch lichtmikroskopische Auszählung wurde nach Färbung mit 0,2 % Trypanblau die Lebendzellzahl bestimmt. Jeweils zwei Hämocytometer wurden ausgezählt und die Zellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung berechnet.

3.1.2.2 MTT-Test

Der MTT-Test dient der Quantifizierung der Zellzahl. MTT wird durch mitochondriale Dehydrogenasen, die mit metabolischer Aktivität assoziiert sind, reduziert. Durch diese Reaktion entsteht eine bläuliche Farbe, welche in Lösung photometrisch gemessen werden kann.

Pro 24-Well wurden zu dem bereits vorhandenen Medium (1 ml) jeweils 500 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) zugegeben und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden das Medium mit der MTT-Lösung abgeschüttet und die adhärennten Zellen ca. 3 min trocknen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit je 600 µl DMSO/24-Well lysiert und ein Teil des Zellysates konnte photometrisch in einem ELISA-Reader (Titertek Multiskan Plus) bei 570 nm gemessen werden.

3.1.3 RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde aus sedimentierten kultivierten Jurkat-Zellen mittels RNeasy Midi Kit isoliert. Das Zellpellet wurde hierzu in 700 µl RLT-Lysepuffer aufgenommen und gemischt. Die weitere Behandlung erfolgte nach Herstellerangaben der Firma Qiagen: Dem Lysat wurde 350 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt, und nach anschließendem Mischen auf die Säule gegeben. Bei ≥ 8000 g wurde diese für 15 sek zentrifugiert. Danach wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 sek bei ≥ 8000 g zentrifugiert, ebenfalls nach Zugabe von 500 µl RPE Puffer. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE Puffer und Zentrifugation bei ≥ 8000 g für 2 min, wurde die Säule auf ein frisches Eppendorf-Gefäß gesetzt und die RNA mittels 50 µl DEPC-Wasser bei Zentrifugation für eine Minute und ≥ 8000 g eluiert.

3.1.4 Lyse und Proteinextraktion

Zur *Lyse* wurden die HepG2-, COS-7 bzw. Jurkat-Zellen zunächst mit PBS gewaschen und je nach Menge mit entsprechendem Volumen Lysepuffer 15 min bei RT lysiert. Das Zellysate wurde anschließend bei 4°C und 14000 Umdrehungen in der Universalzentrifuge 16R für > 10 min zentrifugiert, so daß Zellreste präzipitierten. Der *Protein-Überstand* diente weiteren Untersuchungen und wurde bei -80°C gelagert.

3.1.5 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin (HE) – Färbung wurde zur Identifikation der apoptotischen Zellen nach Zytostatikabehandlung anhand ihrer charakteristischen morphologischen Merkmale, wie Chromatinkondensation, Zytoplasmaschrumpfung etc., durchgeführt. Dazu wurden die HepG2-Zellen auf Objektträgern ausgesät, mit Zytostatika behandelt und für die HE-Färbung fixiert. Hierbei wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 5 min mit -20°C kaltem Methanol, anschließend 30 sek mit -20°C kaltem Aceton behandelt und an der Luft trocknen gelassen. Nach Alkohol-, Hämatoxylin- und Eosinbehandlung konnten die apoptotischen im Verhältnis zu den nicht apoptotischen Zellen ausgezählt werden. Die Differenz zwischen der Zahl apoptotischer Zellen nach Zytostatikabehandlung und der Zahl von apoptotischen Zellen in einer unbehandelten Kontrolle ergab dann den Anteil Zytostatika-induzierter Apoptosen.

3.1.6 Transiente Transfektion von Säugerzellen

3.1.6.1 Lipofektion

Die Transfektion erfolgte mit dem Fugene 6-Transfektionsreagenz der Firma Roche Diagnostics nach Herstellerangaben. Dabei handelt es sich um ein Reagenz auf Lipidbasis, das einen Komplex mit der DNA bildet. Dieser Komplex bindet sich an die Zelloberfläche und wird dann von den Zellen internalisiert. Das Transfektionsgemisch bestand aus:

3 μ l	Fugene 6-Transfektionsreagenz
97 μ l	serumfreien Medium
2 μ g	DNA.

Vor der Transfektion wurde das bei -20°C gelagerte Fugene-Reagenz 15 min bei RT aufgewärmt und aufgeschüttelt. 3 μ l des Reagenzes wurden zu 97 μ l serumfreien Medium zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Dieses Gemisch wurde dann auf 2 μ g DNA-Lösung (bis zu 10 μ l) geträufelt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Auf den mit 2 ml Medium in 35 mm Schalen kultivierten Zellen konnte es tropfenweise zugegeben und nach Bedarf belassen werden.

3.1.6.2 DEAE-Dextran - Methode

Die DEAE-Dextran-Transfektion erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Holter (Holter et al., 1989). Bei diesem Vorgehen wird die positive Ladung des DEAE-Dextrans ausgenutzt, um die negativ geladene DNA an die Zellmembran zu binden. Nach Zugabe von Chloroquin kann es so zu einer Aufnahme in das Zellinnere kommen.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS der in 35 mm Schalen kultivierten Zellen wurden diese mit einer Lösung, bestehend aus 2 μ g DNA, 15 μ l DEAE-Dextran (10 mg/ml) und 300 μ l PBS, überschichtet und für 10-30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 ml Medium mit 80 μM Chloroquin zugegeben und erneut für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte eine kurze DMSO-Behandlung, bei der das Medium vollständig abgesaugt wurde, die Zellen für 2,5 min mit 1 ml 10% DMSO enthaltendem Medium überschichtet wurden und schließlich ein Ersatz des DMSO-Mediums durch 3 ml normales Kulturmedium stattfand.

3.1.7 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Der β -Galaktosidase-Test dient dem Nachweis der erfolgreichen Transfektion mit dem lacZ-Gen.

Jeder Transfektion wurde zu 1/5 der DNA-Menge das Plasmid pCMV- β beigemischt, das die codierende Sequenz der β -Galaktosidase trägt. β -Galaktosidase spaltet die Substanz X-Gal (5-Chloro-4-bromo-3-indoyl- β -D-galactopyranosid). Erfolgreich transfizierte Zellen färben sich aufgrund der erworbenen β -Galaktosidase-Aktivität bei Umsatz des Farbstoffes X-Gal blau bzw. bewirken als Proteinextrakt eine Gelfärbung, die photometrisch gemessen werden kann. So wird bei den Untersuchungen gewährleistet, daß keine Unterschiede die Vergleichbarkeit negativ beeinflussen.

3.1.7.1 β -Galaktosidase-Test bei adhärennten Zellen (fest)

Die Transfektionseffizienz wurde in einem Parallelansatz 48 Stunden nach erfolgter Transfektion bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 10 min bei RT in Fixierlösung inkubiert, erneut zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei RT in Färbelösung inkubiert. Am nächsten Tag waren die Zellen, die das Plasmid pCMV- β enthielten (also transfiziert wurden), blau angefärbt und konnten im Verhältnis zu den nicht-transfizierten lichtmikroskopisch ausgezählt werden. Es wurden pro Ansatz 200 Zellen ausgezählt.

3.1.7.2 β -Galaktosidase-Test im Zellysate (flüssig)

Um aus Proteinlysaten die Transfektionseffizienz bestimmen zu können, wurde der β -Galaktosidase-flüssig-Test angewandt. Für den Test wurden 15 μ l Lysat mit 135 μ l 1X Lysepuffer und 150 μ l 2X Puffer vermischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit trat bei üblicher Transfektion eine Gelbfärbung auf. Um die Reaktion zu stoppen, wurden abschließend 500 μ l 1 M Natriumcarbonat hinzugefügt. Die Extinktion der Proben konnte so im Photometer bei 420 nm gemessen werden.

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte spektrophotometrisch und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} C_{\text{RNA}} (\mu\text{g/ml}) &= \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 40 \\ C_{\text{DNA}} (\mu\text{g/ml}) &= \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50 \\ C_{\text{ssDNA}} (\mu\text{g/ml}) &= \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 33 \end{aligned}$$

Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung ergab das Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$, wobei RNA-Lösungen mit einem $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$ – Wert von 2,0 und eine DNA-Lösung mit einem $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ -Wert von 1,8 als reine Lösungen gelten.

3.2.2 Elektrophoretische Auftrennung

3.2.2.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe des darzustellenden DNA-Fragmentes wurden 1 – 2,5 %ige Agarosegele zur Auftrennung verwendet. Die Agarose wurde in 1X TBE-Puffer gelöst, aufgekocht und gelierte nach Abkühlung auf ca. 40°C in einer entsprechenden Kammer. Die Proben wurden mit Ladebuffer im Volumenverhältnis 6:1 gemischt und aufgetragen. Nach Spannungsauftrennung in der Gelelektrophoresekammer bei 60-100 V mit 1X TBE als Puffersystem erfolgte die Visualisierung der Banden. Dazu wurden die Gele 10 Minuten in 0,1%iger Ethidiumbromidlösung (in TBE) inkubiert und die Banden mittels UV-Licht auf dem Transilluminator sichtbar gemacht.

3.2.2.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

1 g Agarose, 77 ml DEPC-Wasser, 5 ml 20X MOPS-Puffer und 18 ml 100 %iges Formaldehyd wurden gemischt, gekocht und im Gelschlitten auskühlen gelassen. Je 5 µl RNA (0,2µg/µl) wurden 0,9 µl 20X MOPS-Puffer, 3 µl Formaldehyd und 9µl Formamid zugegeben, gemischt, 15 min bei 55°C denaturiert und ins Eisbad gestellt. Nach Auftrag auf das Gel wurden die Proben bei 5 V / cm Laufstrecke aufgetrennt. Als Puffersystem diente 1X MOPS.

3.2.3 Aufreinigung

3.2.3.1 Ethanol-Fällung

Den Nukleinsäuren wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und das 3-5 fache Volumen 100%iges Ethanol hinzugefügt. Nach anschließendem Mischen und 20-minütiger Zentrifugation bei 12000 g und 4°C präzipitierten die Nukleinsäuren. Das Sediment wurde zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Volumen TE-Puffer oder HPLC-Wasser gelöst.

3.2.3.2 Gelextraktion

Zur Isolation eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA nach Gelelektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers über das QIAquick Gel Extraktion Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Dabei wurde die DNA an eine Silicagel-Membran gebunden, Verunreinigungen ausgewaschen und die reine DNA mit HPLC-Wasser eluiert.

3.2.3.3 Säulen-Trennverfahren

Mit Hilfe von Sephacryl S-300 HR-Säulen der Firma Pharmacia Biotech wurden vorwiegend PCR-Produkte nach Herstellerangaben aufgereinigt und in die benötigten Pufferbedingungen überführt. Eine Aufreinigung mit diesen Säulen wurde dadurch erzielt, daß die gewünschten größeren Nukleinsäuremoleküle während der Zentrifugation die Säule verlassen, während kleinere Oligonukleotide, wie z.B. Primer-Dimere, zurückbleiben.

3.2.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Um Inserts aus Plasmiden herauszuschneiden oder Plasmide für eine weitere Klonierung vorzubereiten, wurde ein Restriktionsansatz hergestellt, bestehend aus:

5-10 µg	DNA,
< 1 µl	Restriktionsenzym (3 U/µg DNA),
1 µl	10X Verdau-Puffer (bei Ko-Verdau wurde ein Puffer mit einer möglichst hohen Aktivität für beide Enzyme gewählt)

HPLC-Wasser ad 10 µl

Der Ansatz wurde gemischt und für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.5. Klenow-Auffüllreaktion

Um die Konstrukte für eine Blunt-Ligation vorzubereiten, wurden die überhängenden Fragmentenden mittels „Large Fragment“ of DNA Polymerase I aufgefüllt. Nach Herstellerangaben der Firma Gibco BRL wurde dabei folgender Ansatz auf Eis vorbereitet:

3 µl	10X REACT 2 Puffer,
1 µl	dATP (0,5 mM),
1 µl	dCTP (0,5 mM),
1 µl	dGTP (0,5 mM),
1 µl	dTTP (0,5 mM),
0,5 – 1 µg	DNA,
1 µl	Large Fragment of DNA Polymerase I (0,5 U/µl)

HPLC-Wasser ad 30 µl

Der Ansatz wurde gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Um die Auffüllreaktion zu unterbrechen, wurde anschließend eine Fällung durchgeführt.

3.2.6 Ligation

Für eine Ligation von zwei DNA-Fragmenten wurden die Mengen an Vektor und Insert nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{ng \text{ Vektor} \times \text{Größe des Inserts in kb}}{\text{Größe des Vektors in kb}} \times \text{molares Verhältnis Insert/Vektor} = ng \text{ Insert}$$

Dabei war 3/1 das gewünschte molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor (bei Blunt-Ligation 5/1). Der Ligationsansatz bestand so aus:

1 µl	10X Ligationspuffer,
1 µl	Vektor (50 ng/µl),
x µl	PCR-Produkt,
1 µl	Ligase (3 U/µl)

ad 10 µl HPLC-Wasser.

Das Gemisch wurde mindestens eine Stunde bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert (bei einer Blunt-Ligation bei 16°C über Nacht).

3.2.7 Dephosphorylierung

Zur Verhinderung der Religation aufgeschnittener Plasmide wurden die 5' DNA-Enden nach Restriktion dephosphoryliert. Dies erfolgte mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP), die in der Lage ist, 5'-Phosphatreste sowohl von DNA, RNA, dNTPs als auch rNTPs zu entfernen. Die DNA wurde dabei mit 1X CIP-Puffer und 0,1 U CIP / pmol 5'-terminale Phosphatenden (bei Blunt-Enden 1 U/pmole) vermischt. 2 µg eines 5 kb großen Plasmids entsprachen dabei 1,4 pmol an 5' Enden. Der Ansatz wurde 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 1/20 des Volumens 0,5 M EDTA der Ansatz für 10 min bei 75°C inkubiert.

3.2.8 Genspezifische Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription dient der Herstellung von cDNA anhand von RNA als Template für eine nachfolgende PCR. Das Gemisch für die RT enthielt:

6 µl	5X Puffer,
1 µl	dNTPs (25 mM),
1 µl	3' Primer (10 pmol/µl),
0,5 µl	RNAsin (40 U/µl),
2 µg	RNA,
0,5 µl	AMV-Reverse Transkriptase (10 U/µl)

ad 30 µl mit DEPC-Wasser

Die RT-Ansätze wurden im Thermocycler für eine Stunde bei 50 °C inkubiert.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

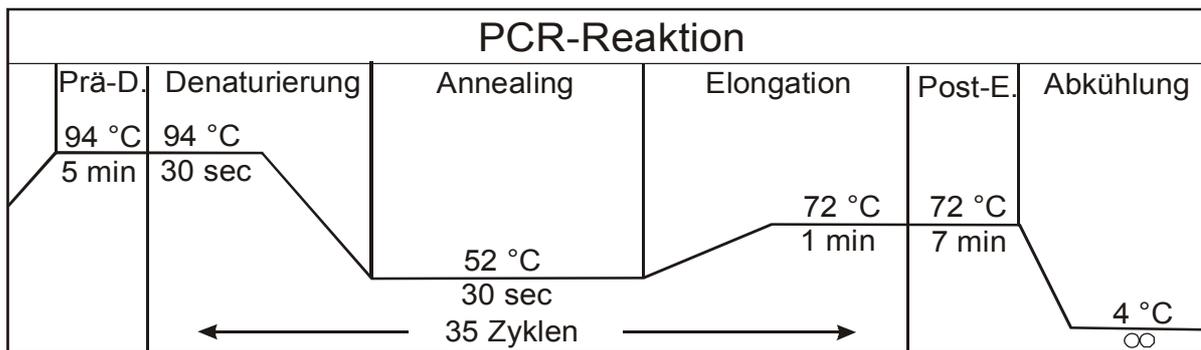
Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Aufgrund von möglichen auftretenden Mutationen mit der Taq-Polymerase wurde, mit Hinsicht auf die nachfolgende Klonierung, die Vent_R DNA-Polymerase mit 3'→ 5' Korrektur-Exonuklease-Aktivität verwendet. Der PCR-Ansatz bestand aus:

10 µl	10X ThermoPol Puffer,
8 µl	dNTPs (je 2,5 mM),
1 µl	3'-Primer (100 pmol/µl),
1 µl	5'-Primer (100 pmol/µl),
3 µl	spezifische cDNA,
0,5 µl	Vent DNA-Polymerase (2 U/µl)

ad 100 µl mit Aqua bidest.

Folgendes PCR-Programm wurde zur Amplifikation verwendet:



I.d.R. wurde eine Annealing-Temperatur von 52°C verwendet, die P10 Untereinheit der Caspase-3 wurde jedoch mit 50°C-Annealing-Temperatur amplifiziert.

3.2.10 Synthese von Adenosin-Nukleotiden an DNA 5'-Enden

Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft an DNA-Fragmente endständig Adenosin-Nukleotide anzuheften. Da diese für eine Ligation mit dem pGEM-T Vektor benötigt werden, wurden die aufgereinigten PCR-Produkte zusätzlich mit der Taq-Polymerase inkubiert. Nach Präzipitation wurden

81 µl	HPLC-Wasser,
4 µl	dATPs (2,5 mM),
5 µl	Taq-Polymerase (1 U/µl),
10 µl	10X Taq-Puffer

zur DNA dazugeben und 30 min bei 72 °C inkubiert.

3.2.11 Sequenzierung von DNA

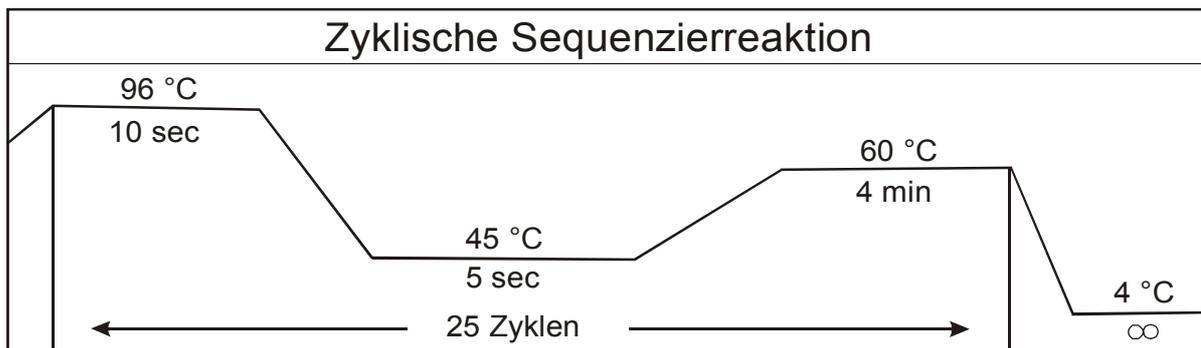
Nach Kontrollrestriktion wurden die Konstrukte zur Überprüfung der fehlerfreien Amplifikation sequenziert. Die Ermittlung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit dem Sequenzierungssystem ABI PRISM 310 der Firma PE Biosystems mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger und Coulson, 1975). Unter Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide trennt das System die Fragmente in einem Polymer der Größe nach auf und erfasst deren Fluoreszenz mit einem Laser. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix durchgeführt.

Ein Ansatz bestand aus:

1 µg	Plasmid-DNA,
1 µl	3`-Primer (10 pmol/µl),
1 µl	5`-Primer (10 pmol/µl),
4 µl	Dye-Sequenzierungsmix

HPLC-Wasser ad 20 µl

Folgendes Programm wurde beim Thermocycler für die Sequenzierreaktion verwendet:



Um die Sequenzierreaktion aufzureinigen wurde eine Ethanol-Fällung mit Aufnahme des Präzipitats in 25 µl Template-Suppression-Reagenz durchgeführt. Die Lösung wurde vermischt und nach 2-minütiger Denaturierung bei 95 °C ins Eisbad gestellt. In Sequenzierröhrchen umpipettiert konnte dann die Reaktion im Genetic Analyser 310 analysiert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit der Datenbank über das BLAST-Programm verglichen und auf Mutationen hin überprüft.

3.3 Proteine

3.3.1 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers (Pierce) bestimmt: 5 µl des Proteinlysates wurden im dreifach Ansatz auf 96 Well-Platten mit 20 µl 1X Lysepuffer und 200 µl der Arbeitslösung vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen den Leerwert gemessen und anhand von vom Hersteller mitgelieferten Proteinstandards geeicht.

3.3.2 Western-Blot

Beim Western-Blot findet ein Membran-Transfer zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen statt. Diese erfolgte mit Hilfe der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970).

- *Probenvorbereitung:*

Die Proteinlösungen wurden 1:1 mit dem SDS-Ladepuffer gemischt, 5 min bei 95 °C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

- *Herstellung des Polyacrylamidgels:*

Da v.a. < 50 kD große Proteinbanden dargestellt werden sollten, wurden zur Auftrennung vorwiegend 15%ige Gele verwendet. Für das Trenngel wurden dementsprechend bei 10 ml Gesamtvolumen 2,3 ml Aqua dest., 5 ml 30%iges Acrylamidgemisch, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) und 100 µl 10%iges SDS gemischt und am Ende zur Polymerisation des Gels 10 µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 4 µl TEMED hinzugefügt, vermischt, in die Gelkammer gegossen und mit 2-Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel in der Gelkammer polymerisiert war, wurde das 2-Butanol abgegossen und darüber ein ca. 3 cm breites Sammelgel geschichtet. Dazu wurden bei 5 ml Gesamtvolumen 3,4 ml Aqua dest., 830 µl 30%iges Acrylamidgemisch, 630 µl 1 M Tris (pH 6,8) und 50 µl 10%iges SDS gemischt und, ebenfalls erst gegen Ende, 50 µl Ammoniumpersulfat und 5 µl TEMED zur Polymerisation hinzugefügt.

- *Elektrophorese:*

Die Auftrennung der Proben in dem Polyacrylamidgel erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA auf einer Laufstrecke von 8 cm bei 4 °C in Laufpuffer.

- *Blotting:*

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und entfernt. Für den Transfer der Proteinbanden auf eine Membran wurde das Gel auf zwei in Transferpuffer getränkte

Whatman-Papiere gelegt und auf ihnen eine ebenfalls in Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran und zwei weitere Whatmanpapiere geschichtet. Diese Schichtung wurde dann in einen Elektrottransferrahmen geklemmt und - mit der Transfermembran zur Kathode gerichtet - in eine Blotkammer gestellt. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 100V und 4 °C im Transferpuffer. Zur Überprüfung des Blots wurden die auf der Membran befindlichen Proteine mit einer Lösung von 0,2 % Ponceau-Rot in 5%iger Essigsäure angefärbt. Die Proteinbanden der mitgeführten Molekulargewichtsstandards wurden mit Kugelschreiber markiert, die Membran anschließend mit Aqua dest. gespült und dann über Nacht bei 4 °C in Blockingpuffer inkubiert.

- *Immundetektion:*

Zuerst wurde die Membran für eine Stunde mit dem Primärantikörper bei RT inkubiert. Dazu wurde je nach Primärantikörper eine 1:200 bis 1:1000 Verdünnung mit Blockingpuffer verwendet. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min in Waschpuffer, wurde sie dann für eine weitere Stunde in einer 1:2000 Verdünnung des peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers in Blockingpuffer bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie nach einer erneuten dreifachen Waschung 5 min in 5 ml Lumi-Light-Lösung bei RT gelegt. Die Visualisierung der Lumineszenz erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms.

3.4 Bakterien

3.4.1 Herstellung kompetenter E. coli zur Transformation

Zur Herstellung von Bakterien, die für eine Aufnahme von DNA sensitiviert sind, wurden 50 ml LB-Medium mit 500 µl einer XL1-Blue Vorkultur ohne Ampicillinzusatz angeimpft. Sobald bei Inkubation im Schüttler die OD₆₀₀ der Bakteriendichte zwischen 0,3 und 0,4 lag, wurden die Bakterien mittels Zentrifugation bei 4000 g pelletiert und anschließend in 15 ml TFBII resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut bei 4000 g zentrifugiert, in 2 ml TFBII aufgenommen und abschließend auf vorgekühlte Eppendorf-Gefäße in 200 µl – Aliquots verteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Bakterien bei –80 °C gelagert.

3.4.2 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA

Transformationen wurden in Anlehnung an das Protokoll von Hanahan durchgeführt (Hanahan et al., 1991). Zu 50 µl einer Suspension kompetenter E. coli wurden 5 µl des Ligationsansatzes gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 sek Hitzeschock im 42 °C Wasserbad wurden die Zellen für 2 min wieder auf Eis gestellt. Zur Expression der für die Antibiotikaresistenz verantwortlichen Enzyme wurden die Bakterien anschließend unter Zusatz von 450 µl SOC-Medium eine Stunde bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in Aliquots auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen:

pGEM-T: LB-Agar + 100 µg/ml Ampicillin + 20 µg/ml X-Gal (für eine Blau-Weiß-Selektion, wobei die weißen Kolonien das Plasmid enthielten)

Two Hybrid Vektoren: LB-Agar + 100 µg/ml Ampicillin

pEGFP: LB-Agar + 200 µg/ml Kanamycin

Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt.

3.4.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus E. coli

Die Plasmid-DNA wurde aus transformierten E. coli XL-1 Blue gewonnen.

- *Amplifikation:*

Zur Herstellung von Vorkulturen wurden die gepickten Kolonien einer Agarplatte samt Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium mit 1:1000 verdünnter Ampicillin-Lösung (50 mg/ml) über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Kulturen von 200 ml Volumen entstanden durch Animpfung von 200 ml ampicillinversetztem LB-Medium mit 1 ml Vorkultur nach Inkubation im Schüttler über Nacht.

- *Extraktion:*

Die Isolierung der DNA aus Vorkulturen mit 5 ml Volumen erfolgte mit dem QIAquick Plasmid Mini Kit, aus Kulturen von 200 ml Volumen mit dem Maxi Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

3.4.4 Glycerol-Stammkulturen

Zur Aufbewahrung transformierter E. coli wurden Glycerol-Stocks aus Vorkulturen angefertigt. Dazu wurde zu 1000 µl Bakterien-Suspension 500 µl 50%iges Glycerol (in Aqua dest.) hinzugefügt, gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.5 Versuchsdurchführungen

3.5.1 Zytostatikabehandlung Survivin-transfizierter HepG2-Zellen

Die Zytostatikabehandlung Survivin-transfizierter HepG2-Zellen diente zur Untersuchung des Einflusses von Survivin und seinen Spleißvarianten auf eine Zytostatika-induzierte Apoptose. Um zu gewährleisten, daß alle Zellen bei der Behandlung in einem physiologisch vergleichbaren Zustand sind, wurde das Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen untersucht und der Anstieg der Zelldichte ohne Mediumwechsel in einem Diagramm erfaßt. Für die Bestimmung der Wirkkonzentration der verwendeten Zytostatika wurden Verdünnungsreihen erstellt, anhand derer die Konzentration mit ungefähr 50 %iger Letalität der HepG2-Zellen ersichtlich war. Durch den Einsatz einer solchen Konzentration wurde gewährleistet, daß sich als Konsequenz der Transfektion die Zellzahl sowohl nach oben als auch nach unten genügend verändern kann. Nach Aussaat der Zellen am Vortag wurden sie mindestens in einem Dreifachansatz mit den pEGFP-Konstrukten Survivin, Survivin- Δ Ex3, Survivin-2B und dem Leervektor pEGFP-N3 transfiziert. Zusätzlich zur Mock-Kontrolle, die den Einfluß der Transfektion auf das Zellüberleben untersucht, wurden eine Kontrolle mit Zytostatikum, aber ohne Transfektion und eine Leekontrolle ohne Zytostatikum getestet. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zytostatika Colchicin, Topotecan und Etoposid unter Mediumwechsel zugegeben und für 48 Stunden belassen. Nach dieser Zeit wurde die Lebendzellzahl mittels Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer oder MTT-Test bestimmt. Um den MTT-Test auf seine Aussagekraft hinsichtlich der HepG2-Zellen zu überprüfen, wurden seine Ergebnisse im Vorfeld mit der errechneten Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer verglichen. Eine Eignung stellte sich durch das proportionale Verhalten der Extinktionswerte im MTT-Test zur Zellzahl heraus:

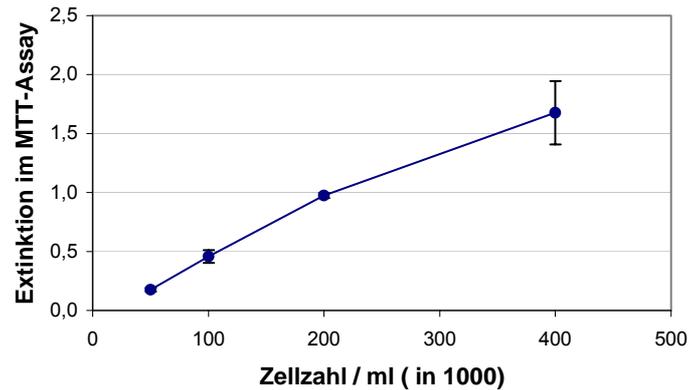
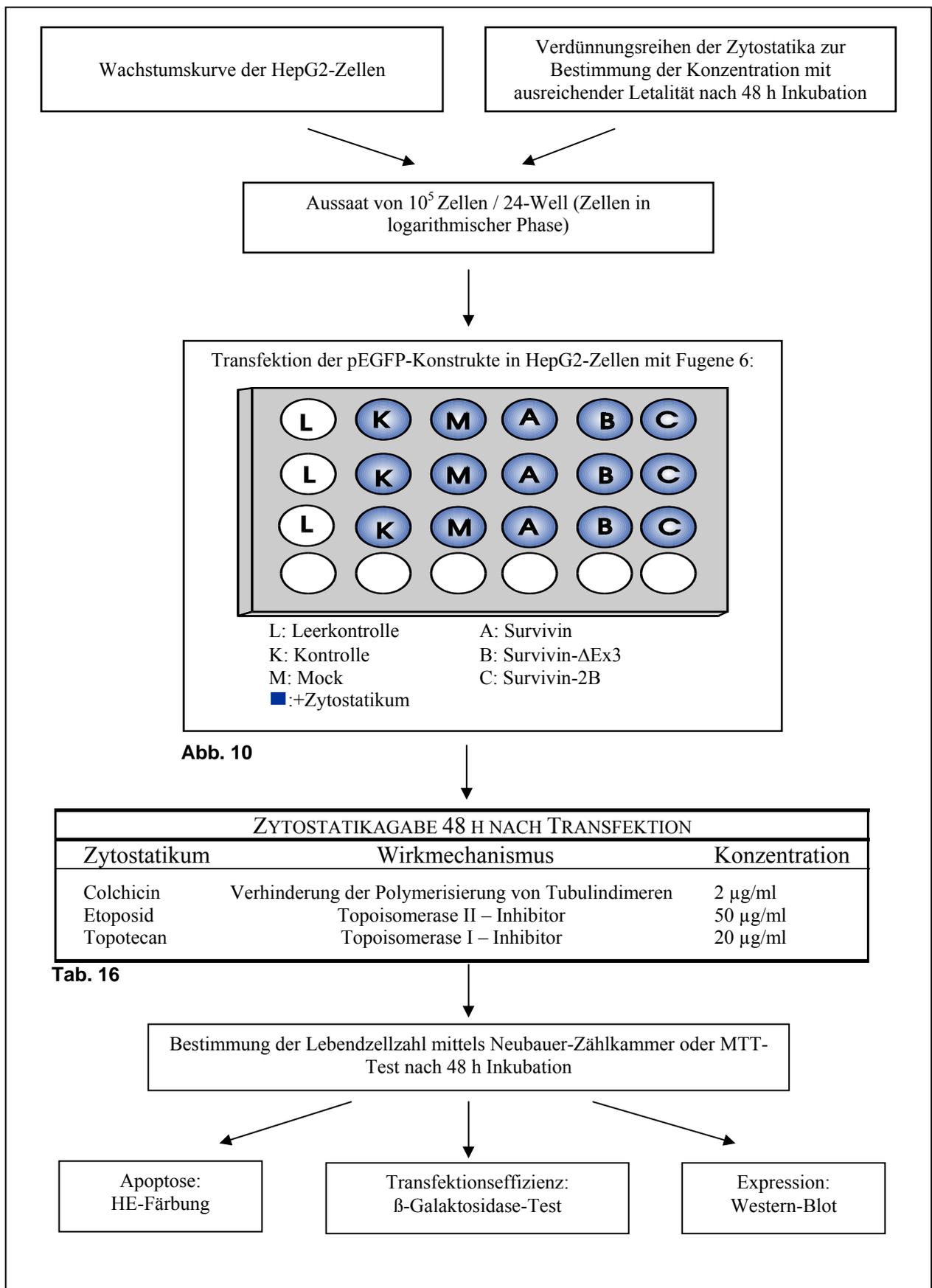


Abb. 9 Kalibrierung des MTT-Testes für HepG2-Zellen

Auf 24-Wellen wurden HepG2-Zellen in jeweils unterschiedlicher Zelldichte (bestimmt mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer) ausgesät und am nächsten Tag mit MTT ausgetestet. Im Extinktionsbereich zwischen 0,5 und 1,0 äußerte sich eine Verdopplung der Zellzahl auch in einer Verdopplung des Extinktionswertes im MTT-Test.

Zusätzlich wurden verschiedene Einflußfaktoren auf den Versuch betrachtet: Mittels HE-Färbung wurde der relative Anteil Zytostatika-induzierter Apoptosen anhand der morphologischen Merkmale, wie Chromatinkondensation, Zytoplasmaschrumpfung, etc. bestimmt. Die Transfektionseffizienz wurde bei jeder Transfektion in einem Parallelansatz über den β -Galaktosidase-Test untersucht und die Expression der Konstrukte im Western-Blot nachgewiesen.

Schematische Darstellung des Versuchablaufs:



3.5.2 CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System

Das CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System dient der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* (Fields und Song, 1989; Sadowski et al., 1988). Bindet das in pBIND klonierte Konstrukt an das in pACT (s. Abb. 10), so assoziieren auch eine Transkription-aktivierende Domäne (VP16) und eine DNA-bindende Domäne (GAL4). Diese Assoziation bewirkt eine Anlagerung des RNA-Polymerase II-Komplexes an die TATA-Box des pG5luc-Vektors und steigert so die Transkription der Luciferase (Reporter-System). Das bedeutet: Eine hohe Luciferase-Aktivität kommt durch eine Interaktion der beiden Proteine aus pACT und pBIND zustande, während keine oder nur geringe Aktivität für eine Nicht-Interaktion spricht.

Zunächst wurden die Konstrukte für die Verwendung im CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System kloniert:

Die *Plasmide* pG5luc, pACT, pACT-MyoD, pBIND und pBIND-Id wurden von der Firma Promega bezogen und für die weitere Verwendung vorbereitet: Zur Amplifikation wurden sie in *E. coli* transformiert. Nachdem Mini-Präps der Plasmid-enthaltenden Klone angefertigt wurden, konnte ein Teil für Glycerol-Stammkulturen, ein anderer für die Plasmidisolierung verwendet werden. Die Plasmidextrakte von pBIND wurden mit BamHI und XbaI von pACT mit EcoRV geschnitten, dephosphoryliert und zur Aufreinigung geextrahiert.

Für den Gewinn der *Caspasen* bzw. ihrer Untereinheiten wurde zunächst RNA aus Jurkatzellen isoliert. Mit den entsprechenden Primern konnten die Konstrukte über RT-PCR amplifiziert werden. Nach Inkubation mit der Taq-Polymerase wurden sie dann in den pGEM-T Vektor zwischenligiert. Zur Umklonierung in pBIND folgten Transformation, Plasmidisolierung, Sequenzierung, Restriktion mit BamHI und XbaI und Ligation in den Two Hybrid Vektor. Eine abschließende Sequenzierung diente vor allem der Überprüfung der richtigen Position der Konstrukte im Leseraster des Plasmids und der fehlerfreien Amplifikation.

Die *Survivin-Konstrukte* wurden freundlicherweise von Dr. Michael Wenzel in pcDNA3.1 kloniert zur Verfügung gestellt. Mit BamHI und KpnI wurden die Konstrukte aus dem Vektor herausgeschnitten. Nach einer Klenow-Auffüllreaktion konnten sie dann „blunt“ in den Two Hybrid Vektor pACT ligiert werden. Eine Umklonierung in den pBIND-Vektor erfolgte durch Restriktion mit BamHI und XbaI.

Die fertigen Konstrukte in pBIND (Caspasen) und pACT (Survivine) wurden in COS-7 / HepG2-Zellen, zusammen mit dem Two Hybrid-Vektor pG5luc und pCMV- β , kotransfiziert. Dies geschah für die Two Hybrid-Vektoren im Verhältnis 1:1:1. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert (Zellen aus einem 24-Well mit 60 μ l Lysepuffer) und der Proteinextrakt für die weiteren Untersuchungen verwendet. Zur Bestimmung der *Luciferaseaktivität* wurden 20 μ l der Probe mit 100 μ l Luciferasesubstrat vermischt und nach 10 sek im β -Szintillationscounter gemessen.

Zusätzlich wurden die verschiedenen Einflußfaktoren auf den Test überprüft: Für einen möglichen Vergleich der Ansätze untereinander wurde sowohl *die Proteinkonzentrationen* als auch der Extinktionswerte aus dem *β -Galaktosidase-Test* in die Aktivitätswerte der Luciferase miteinberechnet.

Schematische Darstellung des Versuchablaufs:

KONSTRUKTE	
pBIND	pACT
Survivin	Survivin
Survivin- Δ Ex3	Survivin- Δ Ex3
Survivin-2B	Survivin-2B
Caspase-3	
Caspase-3P20	
Caspase-3P10	
Caspase-7P20	
Caspase-7P10	

Tab. 17

Transfektion in COS-7- und HepG2-Zellen

Luciferase-Assay 48 Stunden nach erfolgter Transfektion

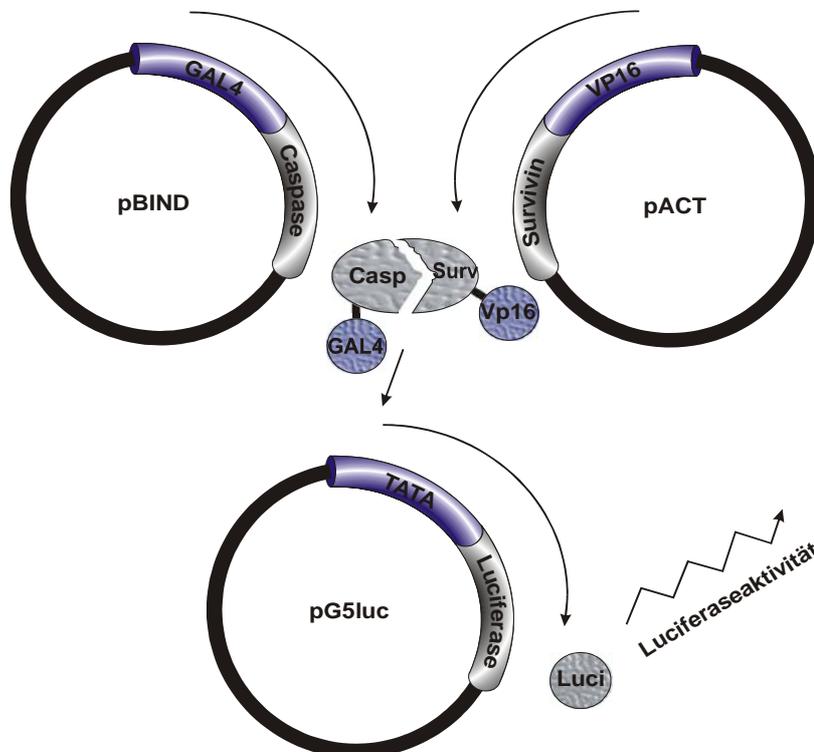


Abb. 11

3.5.3 Caspase-3 Aktivitätstest

Der Caspase-3 Aktivitätstest dient der Quantifizierung der Caspase-3 Aktivität in vitro. Caspase-3 ist in der Lage das Substrat Ac-DEVD-pNA (Teil der PARP-Sequenz) zu spalten, welches in jedem Ansatz vorhanden ist. Eine Spaltung führt zur Gelbfärbung des Gemisches, die photometrisch gemessen werden kann. Die Caspase-3 Aktivität ist somit direkt proportional zur gemessenen Extinktion.

Im Falle einer Caspase-Hemmung durch Survivin würde man eine Reduktion der Caspase-Aktivität und damit der Extinktion erwarten.

3.5.3.1 Tubulin-Polymerisation mittels Taxol

Da die Interaktion zwischen Survivin und Tubulin nur mit polymerisiertem Tubulin stattfindet (Li et al., 1998), fand zur Stabilisation des zum Caspase-3 Aktivitätstest zugefügten Tubulins eine Vorbehandlung mit Taxol statt. Dazu wurde auf Eis folgender Ansatz hergestellt:

20 µl	Tubulin (10 µg/µl)
8 µl	X Tubulin-Puffer
4 µl	GTP (10 mM)
8µl	Aqua dest.

Nach 2 min Inkubation bei 37 °C wurden 4 µl Taxol (1 µM) zugegeben und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten eine Zugabe von 4,4 µl Taxol (10 µM) mit 10 min und 4,8 µl Taxol (100 µM) mit 15 min Inkubation bei 37 °C.

3.5.3.2 Caspase-3 Aktivitätstest

Bei der Durchführung des Caspase-3 Aktivitätstestes wurden folgende Proben als Dreifach-Ansätze verwendet:

10 µl	Protein (0,1 µg/µl Survivin, Survivin-ΔEx3, Survivin-2B oder BL21-Proteinextrakt des E. coli - Stammes)
10 µl	Caspase-3 (10 µg/ml in Puffer)
10 µl	Caspase-3 – Substratgemisch (2 mM in DMSO)
5 µl	Taxol-vorbehandeltes Tubulin (5 µg/µl) (s. 3.5.3.1)

Puffer ad 100 µl

Die Proteine Survivin, Survivin-ΔEx3, Survivin-2B und BL21-Extrakt wurden freundlicherweise von Dipl. Biologin Petra Falkenroth aus einem für humane Codonverwendung optimierten E.coli-Stamm BL21 extrahiert und zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden Puffer, Proteine und Caspase-3 zusammengegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Tubulin wurde das Gemisch für weitere 10 min bei 37 °C

inkubiert. Die Reaktion wurde durch abschließende Zugabe des Caspase-3 - Substratgemisches gestartet. Extinktionsveränderungen wurden alle 20 min über das Photometer gemessen.

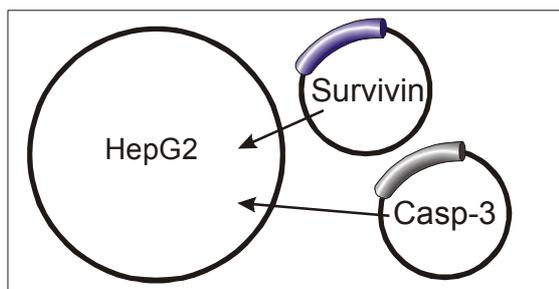
3.5.4 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation dient der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* (Phizicky und Fields, 1995). Aus einem Gesamtproteinextrakt kann ein bestimmtes Protein nach Antikörper- und Protein G – Bindung mittels Präzipitation isoliert werden. Bindet es an ein zweites Protein, wird dieses über die Bindung ebenfalls extrahiert. Im abschließenden Western-Blot besteht der Interaktionsnachweis in einer Detektion des zweiten Proteins nach Präzipitation mit einem Antikörper gegen ersteres.

Um Protein G für eine Verwendung bei der Immunpräzipitation vorzubereiten, wurden 1,5 g Protein G mit 30 ml 50 mM Tris pH 7,5 vermischt und 1–2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 1000 rpm wurde das Präzipitat 4 x mit Lysepuffer (ohne Protease-Inhibitor-Mix, mit 1 mM Na-Azid) gewaschen und erneut in 15 ml Lysepuffer zur weiteren Verwendung aufgenommen.

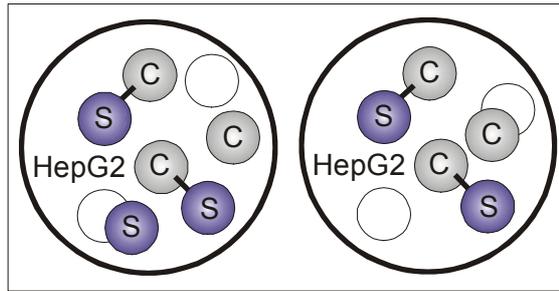
Die Ko-Immunpräzipitation wurde in folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

1.



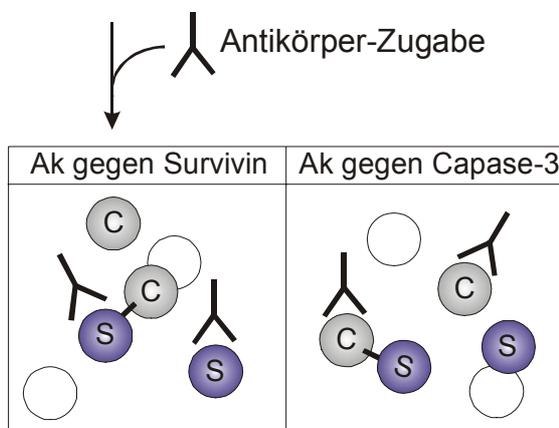
Die Survivin- und Caspasevarianten wurden mittels DEAE-Dextran in HepG2-Zellen kotransfiziert. Auf eine mögliche Interaktion wurden GFP-fusioniertes Survivin und seine Spleißvarianten mit Caspase-3 und Caspase-3P20 in pACT getestet.

2.



48 Stunden nach Transfektion kommt es zur Expression und möglichen Interaktion der Konstrukte.

3.



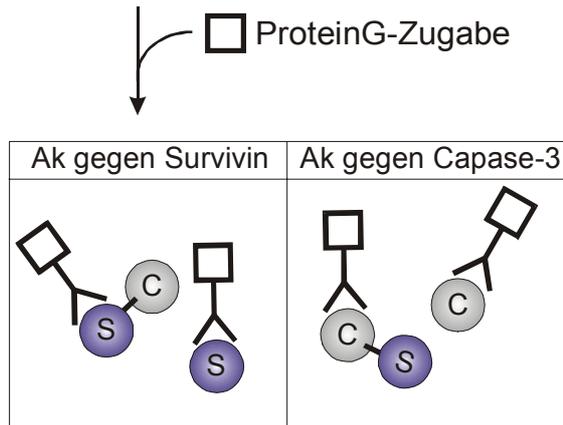
Nach Zellyse und Proteinextraktion wurden Antikörper gegen die Survivin- und Caspasevarianten eingesetzt. Die Interaktionsdomäne zwischen Survivin und Caspase-3 ist nicht bekannt. Da der Antikörper möglicherweise die Interaktion behindern könnte, würde man nur Proteine präzipitieren, die keine Interaktionspartner haben. Durch die doppelte Detektion verringert sich dieses Risiko. Das Gemisch für die Antikörperdetektion bestand aus:

500 – 1000 µg	Protein
1 µg	Antikörper
1/50 der Protein-Antikörper-Lösung 5 M NaCl	

Lysepuffer ad 500 µl.

Nach 90-minütiger Inkubation auf Eis unter mehrmaligem Mischen, wurde die Lösung 10 min bei 4 °C und maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert.

4.



Dem Überstand wurde zur selektiven Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe 50 µl Protein G (1000 mg/ml) hinzugefügt und bei 4 °C 30–60 min rotieren gelassen. Es folgte eine Zentrifugation des Gemisches für 30 sek bei 4 °C mit 1000 rpm und eine dreimalige Waschung des Präzipitates: Mit einer 18-G Hamilton-Spritze wurde der Überstand abgesaugt, 1 ml Lysepuffer zugegeben, gemischt und erneut 30 sek bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert.

Das Präzipitat wurde abschließend in 25 µl 2X Sample-Buffer für die weitere Verwendung im abschließendem Western-Blot aufgenommen.

3.5.5 Immunfluoreszenz

Der Nachweis der Lokalisation der Survivin-Varianten erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion für 10 min mit –20 °C kaltem Methanol fixiert. Als Kerngegenfärbung wurde Propidium-Iodid verwendet. Dazu wurden die Zellen nach Fixation zweimal gewaschen und anschließend eine halbe Stunde mit Propidium-Iodid (1 µg/ml in PBS) bei 37 °C überschichtet. Nach anschließendem zweimaligen Waschen mit PBS wurden sie mit 6 µl Mounting-Medium auf einen Objektträger gelegt und am Rand des Deckglases mit Nagellack fixiert. Bis zur Analyse wurden die Präparate im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Die Präparate wurden mit dem Axioskop der Firma Zeiss analysiert. Die Grün-Fluoreszenz kam durch die Eigenfluoreszenz GFP-Survivin-Fusionsproteine zustande und Rot durch die Propidium-Iodid-Gegenfärbung. Auf zwei getrennten Kanälen für Rot und Grün wurden die Analysen durchgeführt und anschließend überlagert.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluß der Survivin-Überexpression auf die Zytostatika-induzierte Apoptose

Um den Einfluß von Survivin auf einen Zytostatika-induzierten Zelltod im Vergleich zu seinen Spleißvarianten zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen mit den Survivin-Varianten transfiziert. Die Transfektionseffizienz, die mittels eines β -Galaktosidasetests (s. Abb. 12) bestimmt wurde, lag im Durchschnitt bei etwa 40% (dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Effizienz mit einem Fünftel der zur Transfektion eingesetzten Gesamt-DNA erreicht wurde).

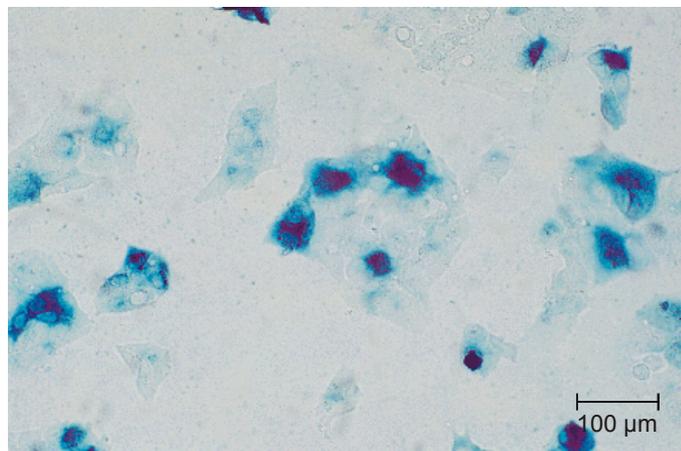


Abb. 12 β -Galaktosidase-Test (fest)

Das Transfektionsgemisch bestand zu 1/5 der DNA-Menge aus pCMV- β , so daß transfizierte Zellen die Fähigkeit erhielten, zugefügtes X-Gal zu spalten. Sie färbten sich dadurch blau an, und ihre relative Anzahl ergab die Transfektionseffizienz. Maßstab: 100 μ m

Die Expression der verschiedenen Survivin-GFP-Fusionsproteine wurde mittels Western-Blot nachgewiesen (s. Abb. 13)

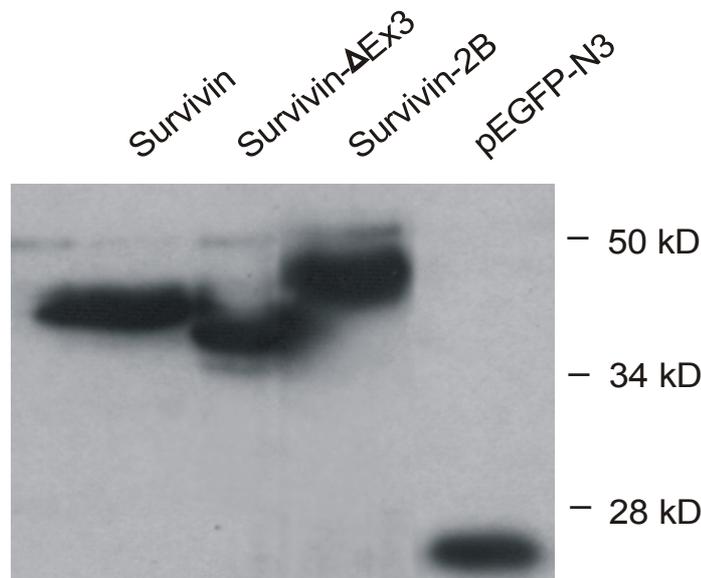


Abb. 13 Western-Blot der GFP-Survivin-Fusionsproteine

48 Stunden nach Transfektion wurden die HepG2-Zellen lysiert. Die Western-Blot Analyse wurde mit 1:1000 verdünnten Antikörpern gegen GFP durchgeführt. Errechnete Proteingrößen der Fusionsproteine: Survivin: 44,5 kD, Survivin- Δ Ex3:43 kD, Survivin-2B:46 kD.

Die in unseren Transfektionsexperimenten gewonnenen Transfektanten wurden anschließend mit drei verschiedenen Zytostatika mit jeweils unterschiedlichem Wirkmechanismus behandelt (vgl. Tab. 18).

ZYTOSTATIKUM	WIRKMECHANISMUS
Colchicin	Alkaloid der Herbstzeitlose; bindet an Tubulindimere und verhindert auf diese Weise die Polymerisierung zur Ausbildung der Mitosespindel
Topotecan	Topoisomerase I – Inhibitor
Etoposid	Glykosidderivat des Podophyllotoxins; Etoposid hemmt einerseits die Enzymaktivität der Topoisomerase II, andererseits stabilisiert es die Bindung dieses Enzyms an DNA-Spaltstellen, die nachfolgend nicht verschlossen werden können. Es bindet zwar auch an Tubulin, scheint dieses jedoch nicht zu hemmen.

Tab. 18

Um einerseits einen deutlichen Effekt der Zytostatika auf den apoptotischen Zelltod, andererseits aber auch einen möglichen anti-apoptotischen Einfluß durch die verschiedenen Survivin-Konstrukte registrieren zu können, waren zunächst Verdünnungsreihen der Zytostatika erstellt und das Zellüberleben nach 48 Stunden gemessen worden (s. Abb. 14).

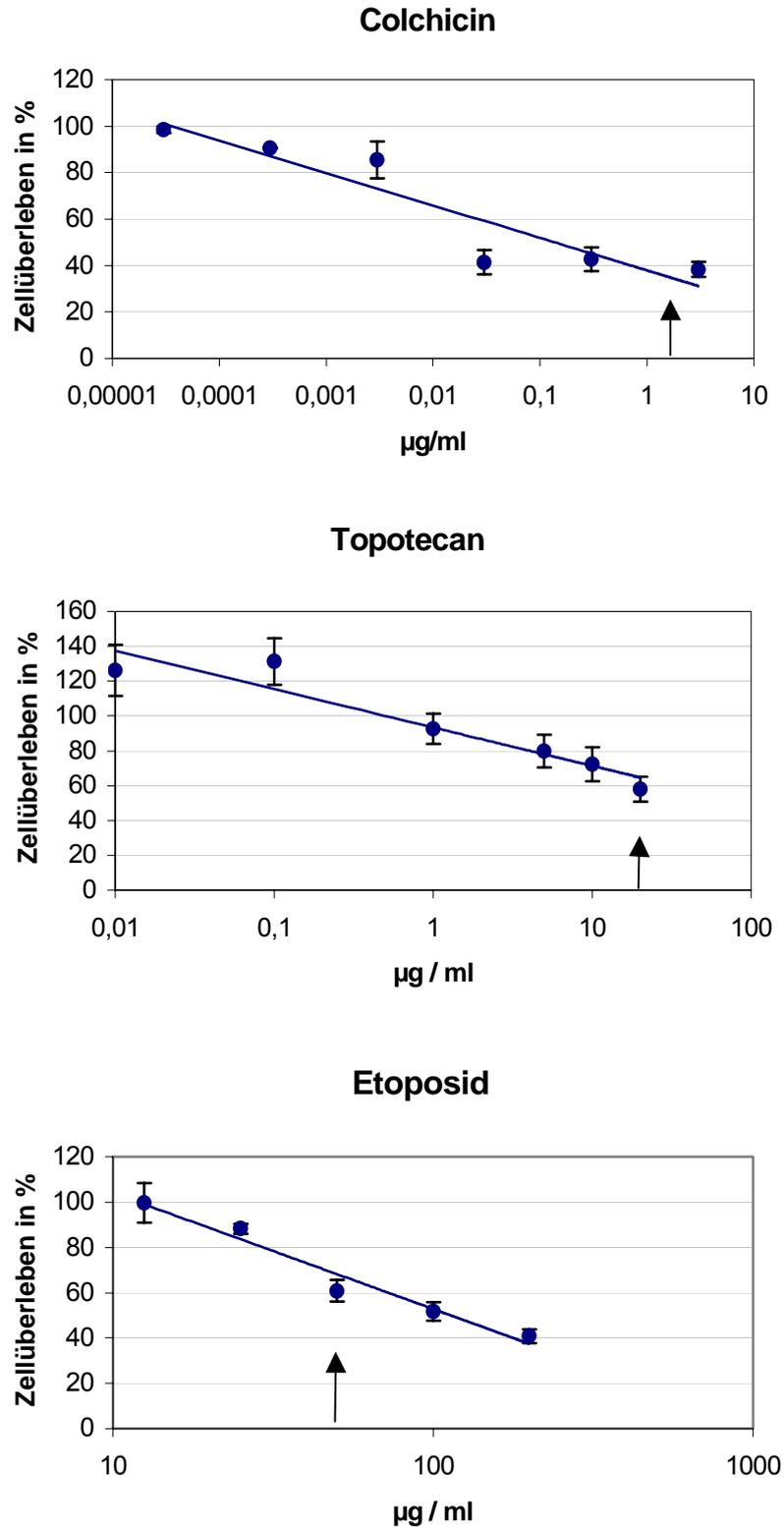


Abb. 14 Zytostatika-Dosisabhängigkeit

HepG2-Zellen wurden in gleicher Zelldichte am Vortag ausgesät und dann mit dem jeweiligen Zytostatikum in unterschiedlicher Konzentration behandelt. Nach 48 Stunden wurde die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt und in Relation zur Leerkontrolle gesetzt. Die Pfeile markieren die verwendete Konzentration für Colchicin von 2 µg/ml, Topotecan 20 µg/ml und Etoposid von 50 µg/ml (↑: ausgewählte Konzentration).

Ausgehend von diesen Meßkurven wurde für die Behandlung der Transfektanten für jedes Zytostatikum jeweils eine Konzentration ausgewählt (Colchicin: 2 µg/ml, Topotecan 20 µg/ml und Etoposid von 50 µg/ml). Eine lichtmikroskopische Analyse zeigte, daß die gewählten Konzentrationen nach 48 Stunden mit einer erhöhten Anzahl von apoptotischen Zelltrümmern einhergingen (s. Abb. 15).

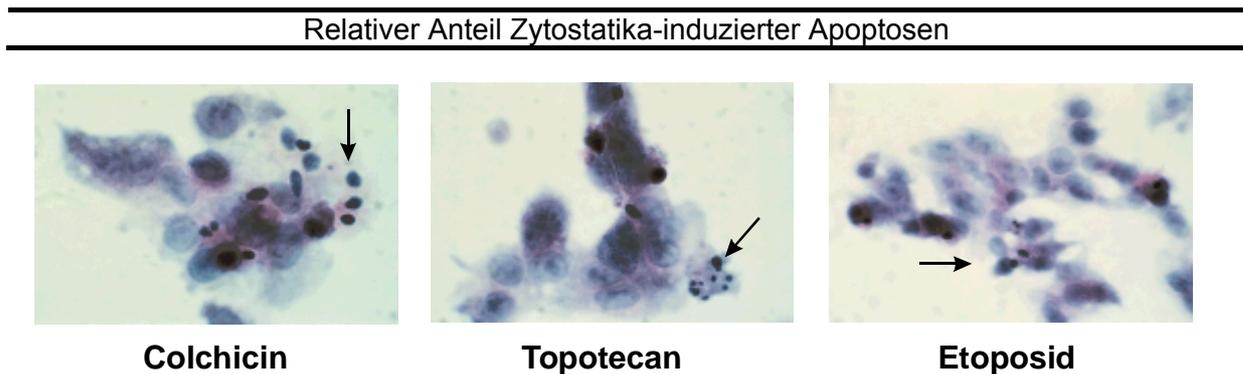


Abb. 15 HE-Färbung Zytostatika-behandelter HepG2-Zellen

48 Stunden nach Beginn der Zytostatika-Behandlung wurden die Zellen HE-gefärbt und apoptotische Zellen (s. Pfeile) im Verhältnis zu den nicht apoptotischen ausgezählt.

- Colchicin, ca. 15 % apoptotische Zellen
- Topotecan, ca. 5 % apoptotische Zellen
- Etoposid, ca. 5 % apoptotische Zellen

Die Zytostatika-Behandlung der Transfektanten wurde in mindestens drei voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt. 48 Stunden nach Zytostatikabehandlung der Transfektanten zeigte sich, daß Survivin und Survivin-ΔEx3 bei keinem eingesetzten Zytostatikum einen nennenswerten anti-apoptotischen Effekt zeigten, während eine Survivin-2B-Überexpression nach 48 Stunden zu einer Abschwächung des Effektes aller drei Zytostatika führte (s. Abb. 16).

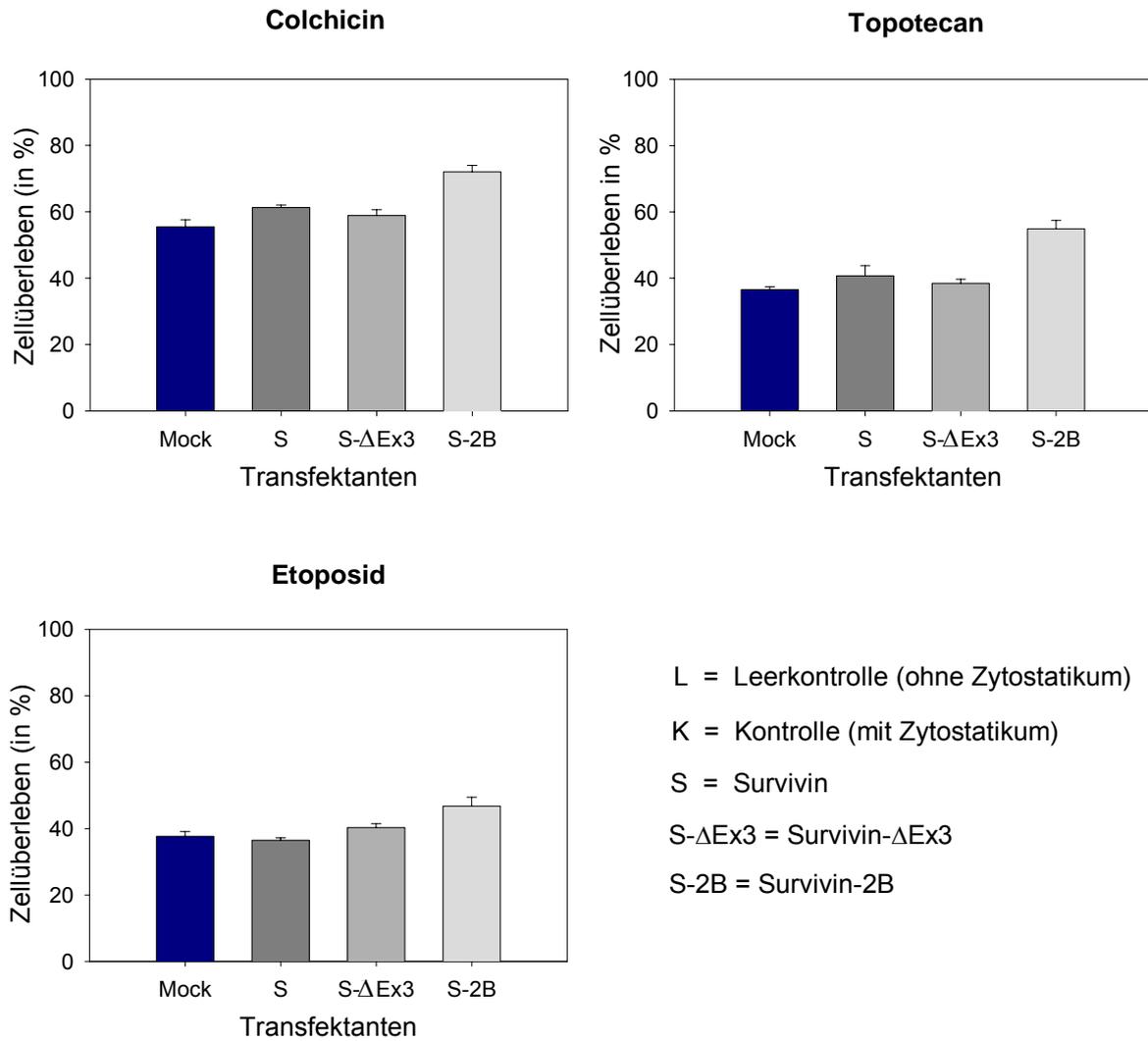


Abb 16 Zytostatika-Behandlung Survivin-transfizierter HepG2-Zellen

Auf 24-Well-Platten wurden die Zellen in jeweils gleicher Dichte ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Nach 48 Stunden wurde das entsprechende Zytostatikum mit Medium verdünnt auf die Zellen gegeben. 48 Stunden später wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer oder MTT-Test bestimmt und in Relation zur Leerkontrolle ohne Zytostatikum gesetzt. Jede Zytostatikabehandlung erfolgte in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

4.2 Caspase-3 und -7: Untersuchung zur Interaktion von Survivin und seinen Spleißvarianten in vivo

Das CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System ist ein sensitives System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen in vivo. Mit Hilfe dieser Methode wurde die in der Literatur kontrovers diskutierte Interaktion von Survivin mit den Caspasen-3 und -7 getestet. Da der Wirkmechanismus der alternativen Spleißvarianten von Survivin weitgehend unbekannt ist, wurden diese im Vergleich zu Survivin in die Untersuchungen miteinbezogen.

4.2.1 Interaktion mit Caspase-3 und -7

Von Tamm et al. wurde erstmals beschrieben, daß Survivin über eine Bindung an die aktiven Formen der Caspase-3 und -7 eine Inhibition der Apoptose bewirkt (Tamm et al., 1998). Eine mögliche Bindung zwischen Survivin und den Caspasen wurde von uns in vivo auch im Vergleich zu den Survivin-Spleißvarianten mittels CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System untersucht.

Zwecks Klonierung wurden die Caspasen und ihre Untereinheiten mittels RT-PCR unter Verwendung isolierter Jurkat-RNA und Caspase-spezifischer Primer amplifiziert (s. Abb. 17 links am Beispiel der Procaspasen). Nach Gelextraktion fand eine Zwischenligation der Caspase-Konstrukte in den pGEM-T-Vektor statt. Für die weitere Verwendung im Two-Hybrid-System wurden die Konstrukte schließlich aus dem Plasmid herausgeschnitten (s. Abb. 17 rechts am Beispiel der Caspase-Untereinheiten) und in den Vektor pBIND umkloniert.

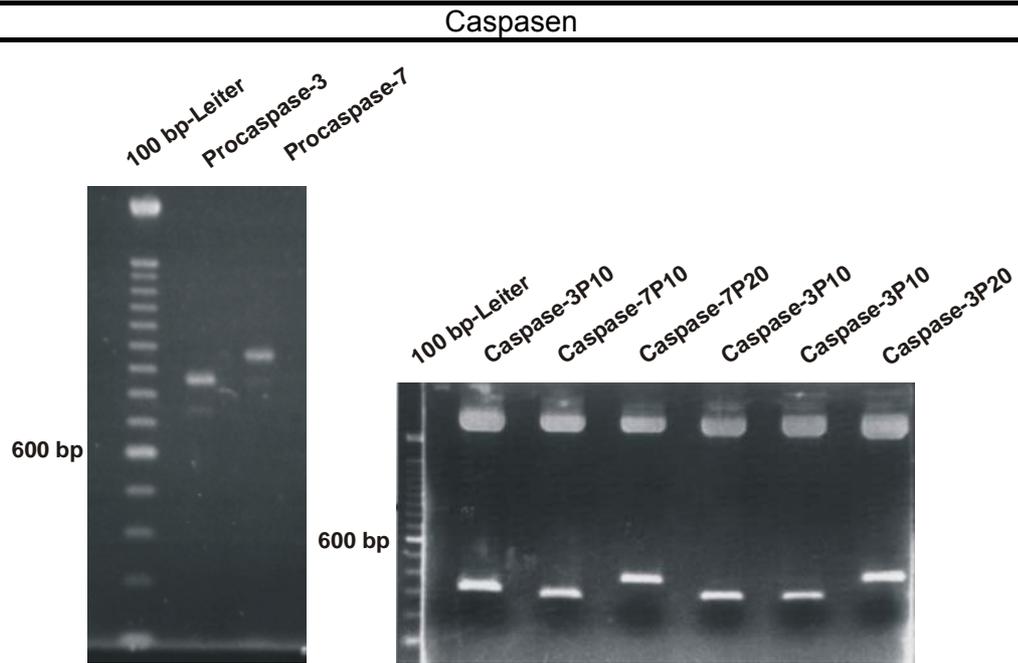


Abb. 17 a) PCR der Procaspasen b) Restriktion der Caspase-Untereinheiten aus pGEM-T

a) Procaspase-3: 833 bp; Procaspase-7: 911 bp; b) Restriktionsenzyme: BamHI und XbaI; Caspase-3P20: 372 bp, Caspase-3P10: 282 bp, Caspase-7P20: 372 bp, Caspase-7P10: 282 bp

Zur Amplifikation der verschiedenen Survivin-Varianten im Two-Hybrid-Vektor pACT wurden die Konstrukte zunächst aus dem Vektor pcDNA3 herausgeschnitten (s. Abb. 18) und abschließend in pACT ligiert.

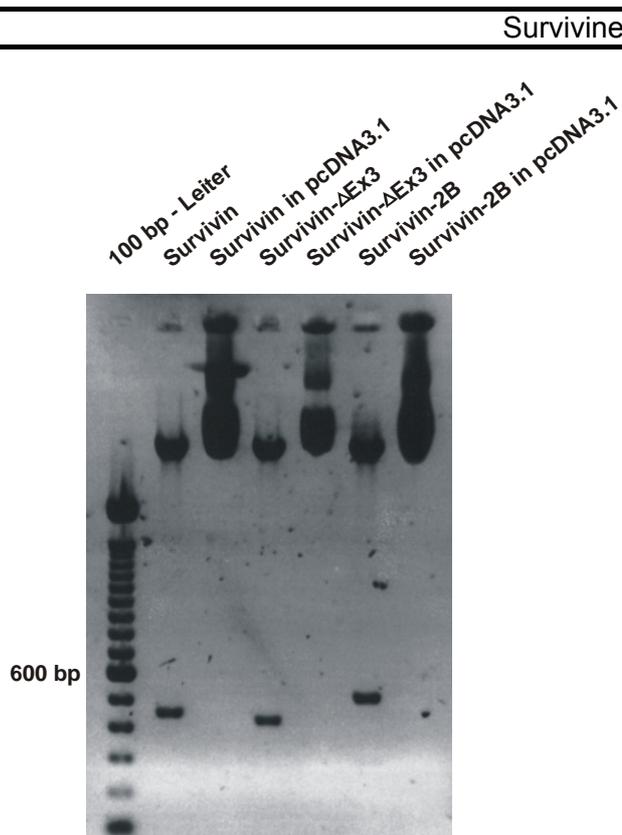


Abb. 18 Restriktion der Survivin-Konstrukte aus pcDNA3.1

Survivin und seine Spleißvarianten wurden aus pcDNA3 mit BamHI und KpnI herausgeschnitten und zusammen mit nicht-restringiertem Plasmid als Verdaukontrolle auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Survivin: 428 bp; Survivin-ΔEx3: 411 bp; Survivin-2B: 495 bp

Die fertigen Konstrukte in pBIND (Caspasen) und pACT (Survivine) wurden abschließend mittels Sequenzierung auf Mutationsfreiheit und ihre richtige Orientierung im Leseraster der Two-Hybrid-Vektoren überprüft (s. Abb. 19).

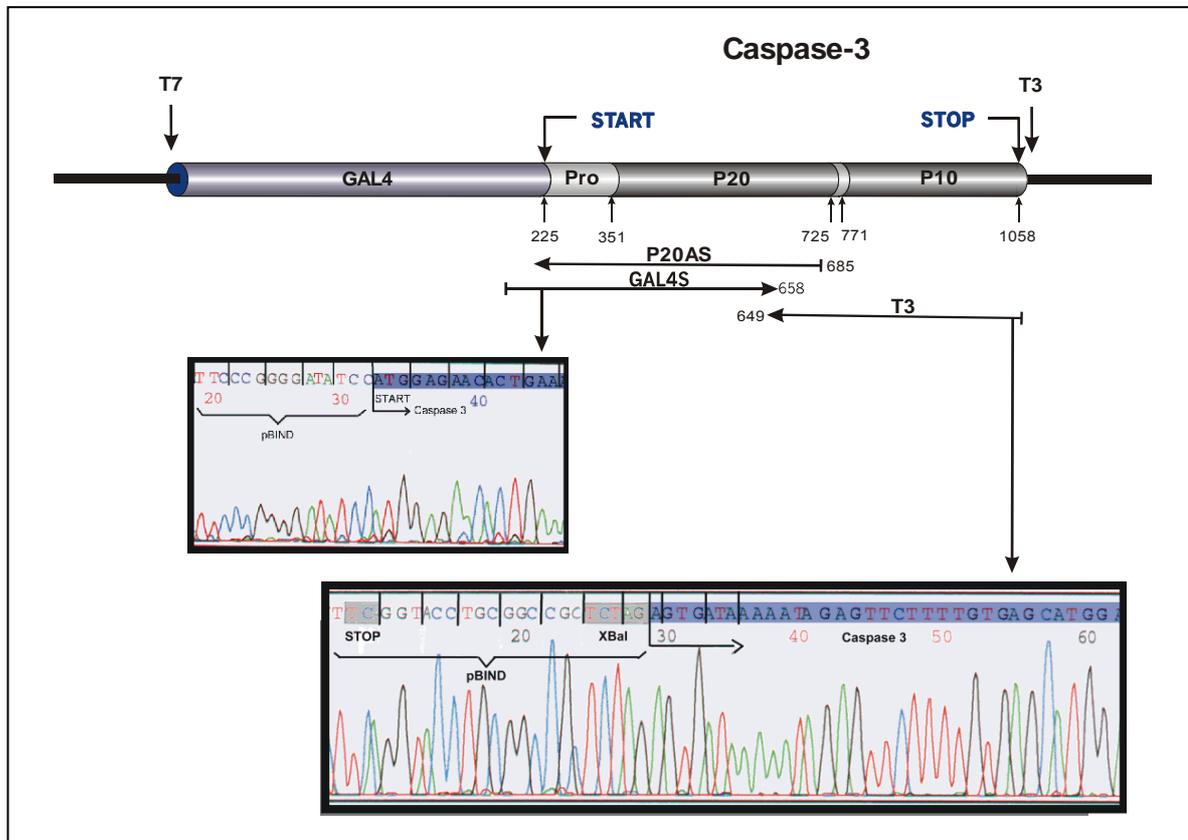


Abb. 19 Sequenzierung der Procaspase-3

Um die Sequenz der Procaspase-3 in voller Länge erfassen zu können, wurden verschiedene Primer verwendet. Die so erhaltenen Sequenzen konnten dann mit DNASTAR überlappt und analysiert werden. Ein Abgleich mit der Datenbank erfolgte über das BLAST-Programm.

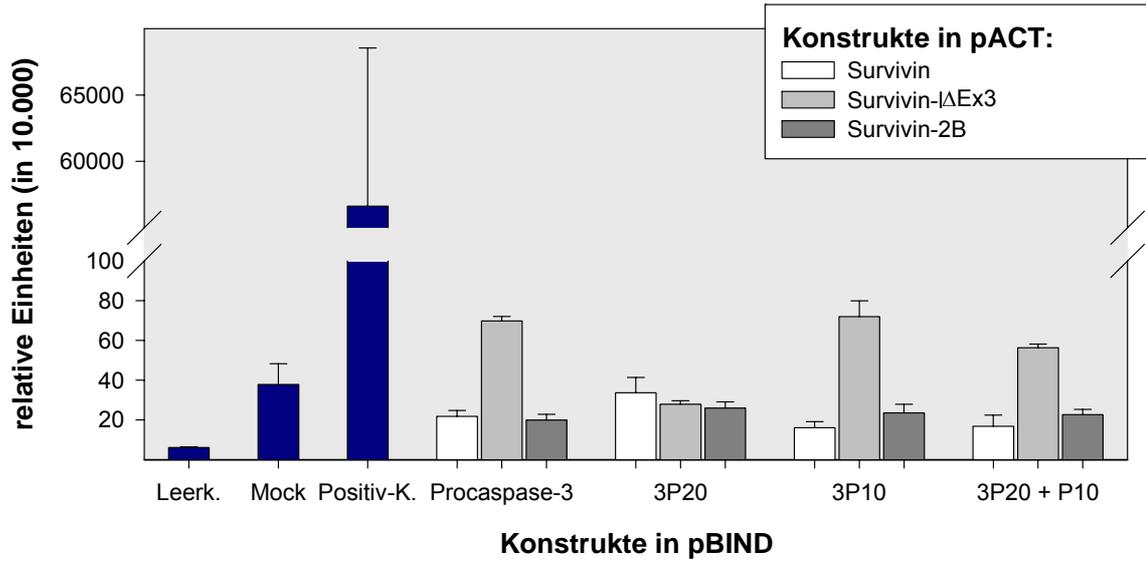
Zur Anwendung im CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System wurden die Plasmid-Konstrukte zusammen mit dem Two Hybrid-Vektor pG5luc und mit pCMV-β kotransfiziert. Die Two-Hybrid-Versuche wurden unabhängig voneinander sowohl mit COS-7 (n=6) als auch mit HepG2-Zellen (n=3) durchgeführt.

Bei der Auswertung des Versuchs wurde in die Berechnung der Luciferaseaktivität, zum möglichen Vergleich der Ergebnisse untereinander, die Proteinkonzentration und der Wert für die Transfektionseffizienz aus dem β-Galaktosidase-Test miteinberechnet. Große Schwankungen traten für diese Werte jedoch nicht auf und veränderten so das Endergebnis nicht.

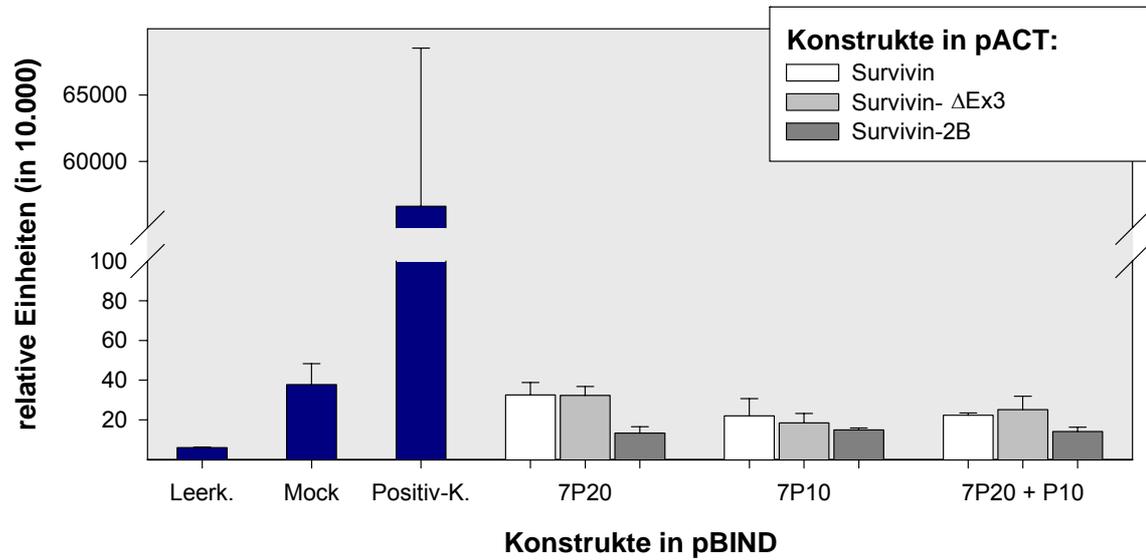
Die Negativ- und Positiv-Kontrollen des Versuchs (s. Abb. 20) definierten den erwarteten Rahmen der Luciferaseaktivität: Die Mock-Kontrolle (Leervektoren + Luciferasevektor pG5luc) zeigt eine leichte basale Luciferaseaktivität im Vergleich zur Leerkontrolle ohne Transfektion. Die von der Firma Promega mitgelieferte Positiv-Kontrolle (Interaktion zwischen pACT-MyoD und pBIND-Id) lag um mehr als das 1000-fache höher als der registrierte Wert für die Mock-Kontrolle. Da in der Literatur eine Interaktion zwischen Survivin und den Caspasen-3 und -7 beschrieben worden war (Tamm et al., 1998; Shin et al., 2001), erwarteten wir eine erhöhte Luciferaseaktivität aufgrund einer Interaktion zwischen Survivin und den Caspasen. In unseren Versuchen lag die Luciferaseaktivität jedoch für die Interaktion mit Caspase-3 und seinen Untereinheiten und den Caspase-7-Untereinheiten im Bereich der Negativ-Kontrollen. Ebenso lagen Luciferaseaktivitätswerte für die Spleißvarianten im Bereich der Negativ-Kontrollen.

Interaktionsuntersuchung zwischen den Survivin-Varianten und Caspase-3 und -7 in HepG2-Zellen

CheckMate Mammalian Two-Hybrid: **Caspase-3**



CheckMate Mammalian Two-Hybrid: **Caspase-7**



Interaktionsuntersuchung zwischen den Survivin-Varianten und Caspase-3 und -7 in
COS-7-Zellen

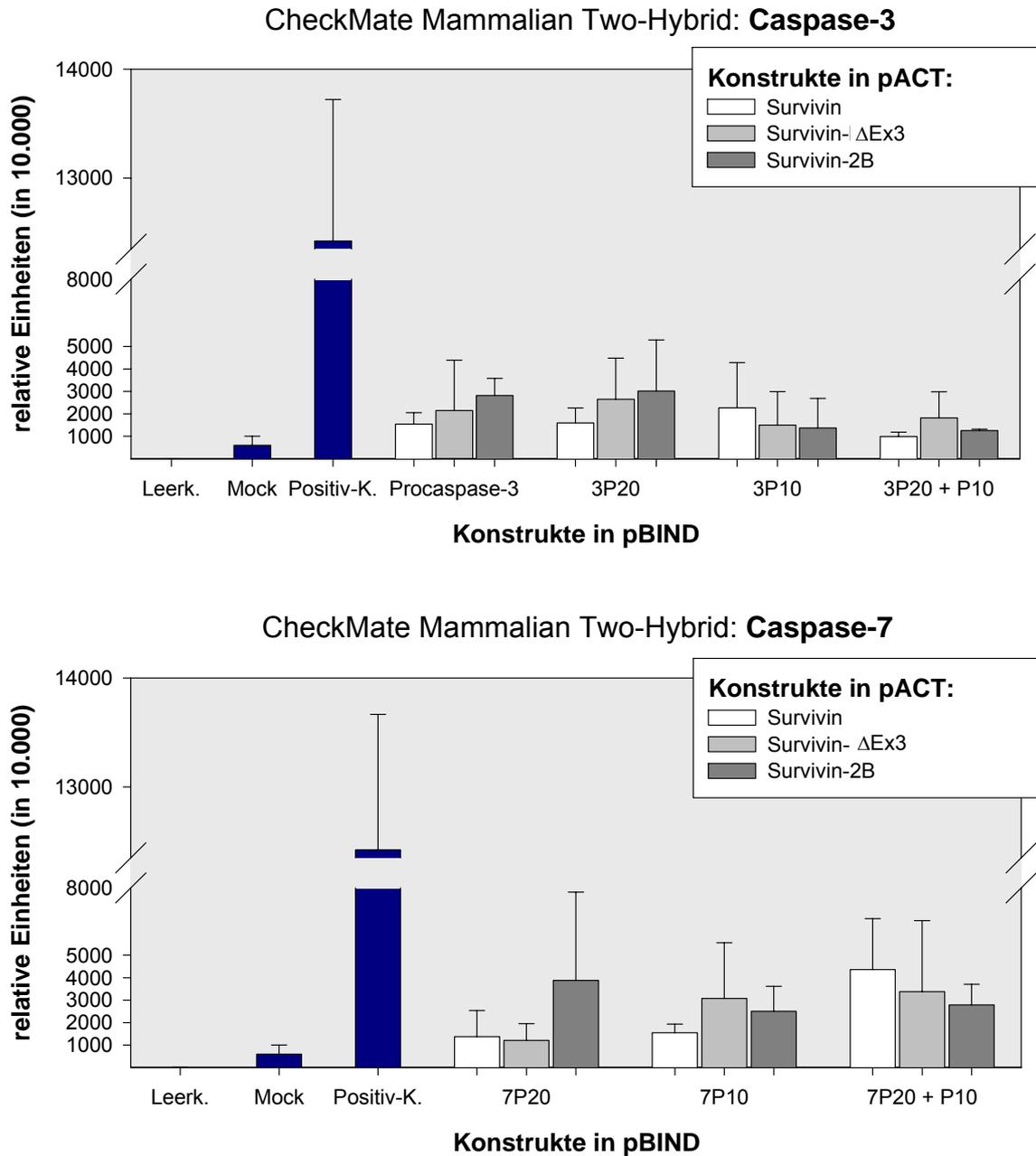


Abb. 20 CheckMate Mammalian Two-Hybrid-System mit Caspase-3 und -7

Die verschiedenen Survivin-Konstrukte im Two-Hybrid-Vektor pACT wurden auf eine Interaktion mit den in pBIND klonierten Caspasen untersucht. Diese Interaktions-Untersuchung wurde sowohl in HepG2- (n=3) als auch in COS-7-Zellen (n=6) durchgeführt. Als Kontrollen dienten die beiden Negativ-Kontrollen Leerkontrolle (HepG2-Proteinextrakt) und Mock (Leervektoren pACT und pBIND) und die von der Firma Promega mitgelieferte Positiv-Kontrolle (pACT-MyoD und pBIND-Id). Eine Interaktion mit Caspase-3 wurde für Procaspase-3, große (3P20) und kleine (3P10) Untereinheit und für beide Untereinheiten zusammen untersucht (oben). Die Interaktionsuntersuchung mit Caspase-7 erfolgte für die große (7P20) und kleine (7P10) Untereinheit der Caspase-7 und ebenfalls für beide zusammen (unten).

4.3 Homo- und Heterodimerisierung von Survivin und seinen Spleißvarianten in vivo

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde aufgrund von Strukturanalysen in vitro Survivin als Dimer beschrieben (Chantalat et al., 2000; Muchmore et al., 2000; Verdecia et al., 2000). Mit Hilfe des CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid Systems wurde Survivin in vivo sowohl auf eine Interaktion mit sich selbst als auch mit seinen Spleißvarianten Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B hin untersucht.

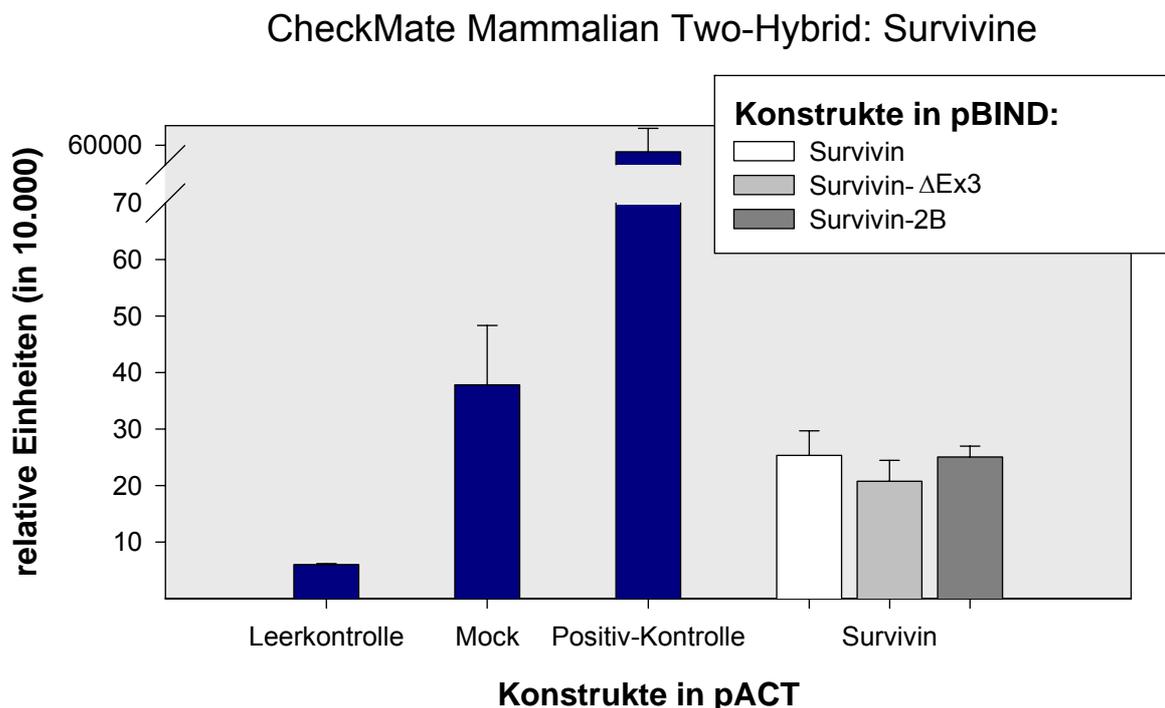


Abb. 21 CheckMate Mammalian Two-Hybrid-System mit Survivin und seinen Spleißvarianten

Die verschiedenen Survivin-Konstrukte im Two-Hybrid Vektor pBIND wurden auf eine Interaktion mit Survivin in pACT untersucht. Auch hier dienten als Kontrollen die beiden Negativ-Kontrollen Leerkontrolle (HepG2-Proteinextrakt) und Mock (Leervektoren pACT und pBIND) und die von der Firma Promega mitgelieferte Positiv-Kontrolle (pACT-MyoD und pBIND-Id).

Auch für die Interaktion zwischen Survivin mit sich selbst und seinen Spleißvarianten wurden lediglich Luciferaseaktivitätswerte auf Höhe der Negativ-Kontrollen (Leer- und Mock-Kontrolle) registriert, so daß sich in diesem Assay keine Hinweise auf eine Homodimer-Bildung von Survivin oder die Bildung von Survivin-Survivin- Δ Ex3- bzw. Survivin-Survivin-2B-Heterodimeren ergab.

4.4 Caspase-3: in vitro-Interaktionspartner von Survivin?

4.4.1 Ko-Immunpräzipitation

Der in vivo Interaktionstest zwischen Survivin und den Caspasen-3 und -7 wurde in vitro mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation überprüft. Dazu wurden Survivin und seine Spleißvarianten als GFP-Fusionsproteine, Procaspase-3 und die Caspase 3P20 Untereinheit verwendet. Zur Detektion wurden einerseits Survivin-Antikörper (gegen GFP / Survivin), andererseits auch Antikörper gegen Caspase-3 eingesetzt. Eine mögliche Behinderung einer Bindung der Survivine an die Caspase-3 durch den verwendeten Antikörper kann bei unbekannter Bindungsdomäne nicht ausgeschlossen werden. Deshalb stellt dieser doppelte Antikörpereinsatz gegen das Interaktionsprodukt eine zusätzliche Absicherung des Ergebnisses dar. Auch mit dieser Methode war keine Bindung von Survivin oder seinen Spleißvarianten an Caspase-3 oder seine große Untereinheit nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Caspase-3 Aktivitätstest in vitro

Eine zusätzliche Untersuchungsmöglichkeit der Beeinflussung von Caspase-3-Aktivität durch Survivin oder seine alternativen Spleißvarianten bietet der in vitro Caspase-3-Aktivitätstest. Da Survivin an Mikrotubuli bindet und es bei Spaltung dieser Bindung zu einer erhöhten Caspase-3 Aktivität kommt (Li et al., 1998), wurde der Caspase-3 Aktivitätstest sowohl mit als auch ohne Tubulin-Zusatz durchgeführt. Nachdem die Zugabe von nicht-polymerisiertem Tubulin keinen signifikanten Einfluß zeigte (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe), wurde eine Taxol-Vorbehandlung des Tubulins in unseren Versuchen durchgeführt. Mit Hilfe einer Taxol-induzierten Polymerisation sollte ein Tubulin-bedingter inhibitorischer Effekt des Survivins erreicht werden. Casputin der Firma Biomol (für eine Hemmung diente die BIR-Domäne 2 und 3 von XIAP) lieferte als Positiv-Kontrolle eine zusätzliche Absicherung der Methode, indem eine Caspase-Hemmung über eine Extinktionsabnahme registriert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Im Vergleich zu den beiden Negativ-Kontrollen (Leerkontrolle und BL21-Protein) konnte keine *Reduktion* der spontanen Caspase-3 Aktivität durch Survivin oder seine Spleißvarianten registriert werden. Auch ein Tubulin-Zusatz zeigte keine *Reduktion* in der enzymatischen Spaltung (s. Abb. 22).

 Caspase-3-Aktivitätstest mit Survivin und seinen Spleißvarianten

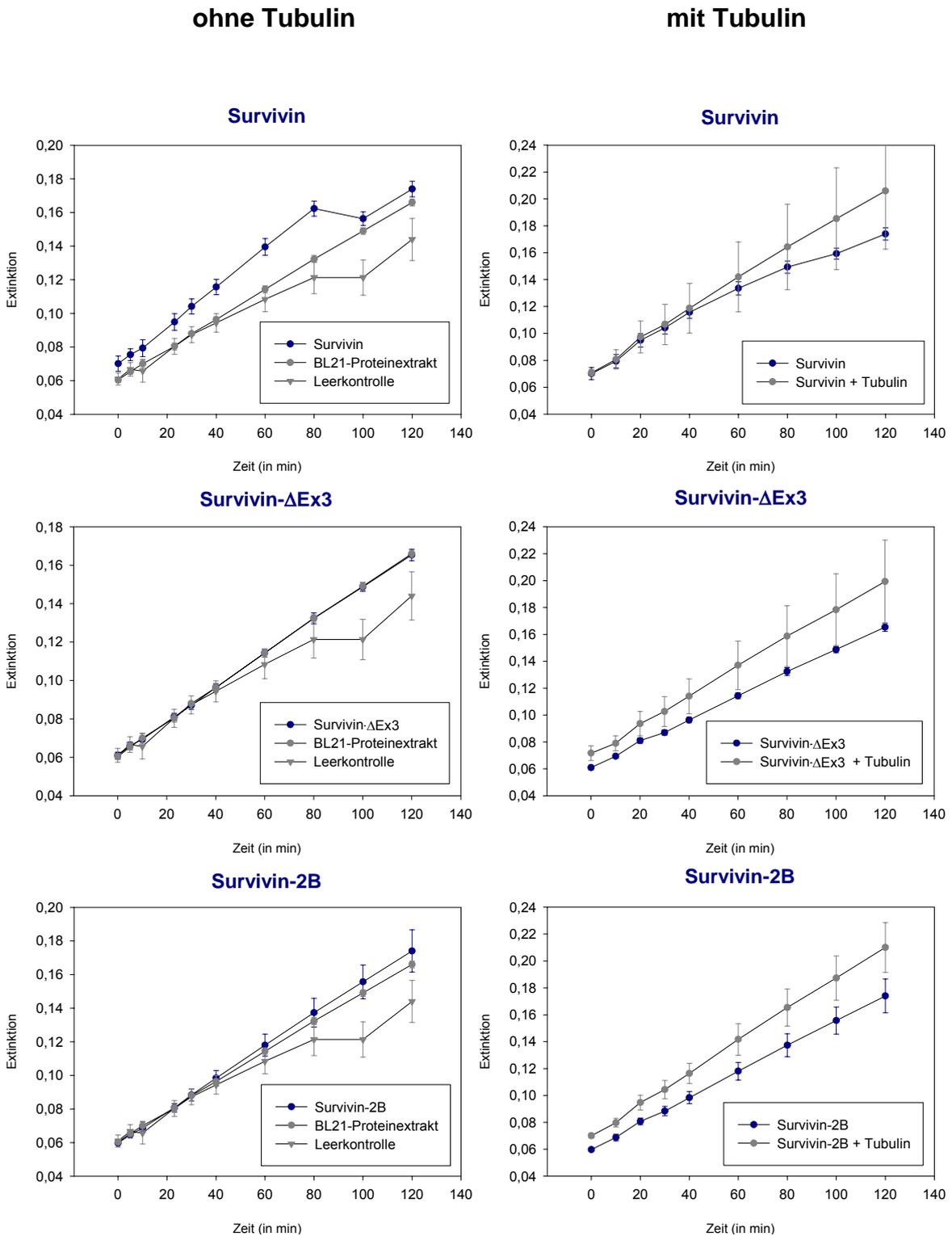


Abb. 22 Caspase-3 Aktivitätstest

Die Aktivität der Caspase-3 wurde mindestens alle 20 min nach Zugabe der verschiedenen Proteine (Survivin, Survivin- Δ Ex3, Survivin-2B und BL21-Proteinextrakt) aufgezeichnet. Die Survivine wurden sowohl mit als auch ohne Tubulin zugegeben. Als Negativ-Kontrollen dienen der BL21-Proteinextrakt und die Leerkontrolle (ohne Protein). Die steigende Extinktion zeigt eine spontane Aktivität der Caspase-3 an.

4.5 Subzelluläre Lokalisation von Survivin nach Zytostatika-Induktion

Nach bisherigen Veröffentlichungen scheint die subzelluläre Lokalisation von Survivin von besonderer funktioneller Bedeutung zu sein. So wurde von Suzuki et al. bei Apoptoseinduktion, etwa durch CD95, eine Translokation von Survivin in den Zellkern beschrieben (Suzuki et al., 2000b). Wir haben deshalb mittels Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisation von Survivin und seinen Spleißvarianten nach einer Zytostatikabehandlung untersucht. Dabei zeigte sich nach Zytostatikabehandlung, im Vergleich zur Kontrolle ohne Zytostatikum, keine Translokation von Survivin aus dem Zytoplasma in den Zellkern (s. Abb. 23). Wie bereits von Mahotka et al. (Mahotka et al., 2002) und auch Rodriguez et al. (Rodriguez et al., 2002) gezeigt wurde, finden sich Survivin und Survivin-2B vorwiegend im Zytoplasma, während Survivin- Δ Ex3 im Kern der HepG2-Zellen lokalisiert ist.

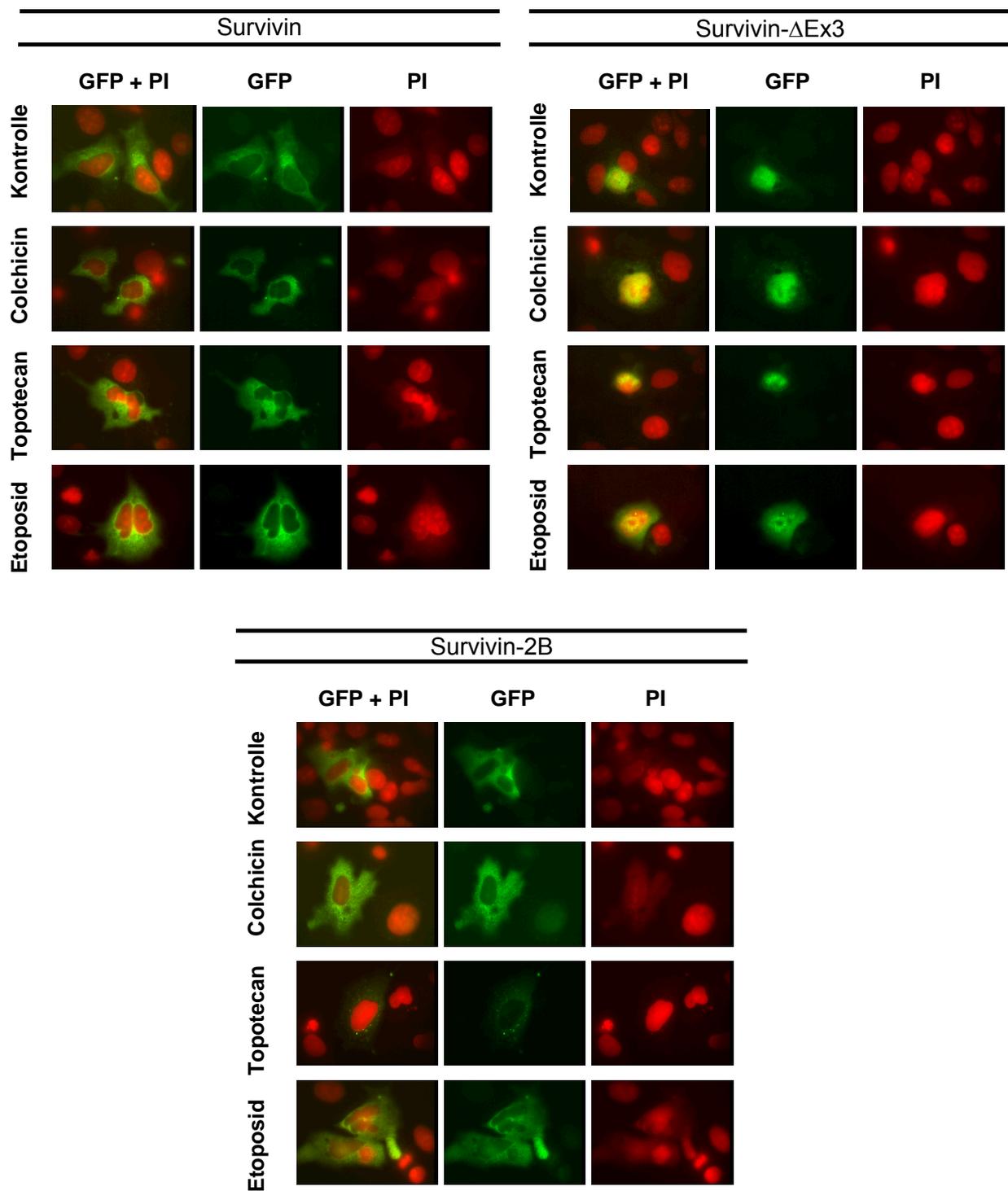


Abb. 23 Immunfluoreszenz-Bilder der Zytostatika-behandelten Transfektanten

48 Stunden nach Transfektion der verschiedenen Survivin-Varianten wurde für 24 Stunden das jeweilige Zytostatikum zugegeben. Grün: Fluoreszenz der GFP-Survivin-Fusionsproteine; Rot: Kerngegenfärbung mit Propidium-Iodid

5 Diskussion

5.1 Einfluß der Survivin-Expression auf die Zytostatika-induzierte Apoptose

Zytostatika wirken u.a. über eine Induktion der Apoptose: Von Fulda et al. konnte gezeigt werden, daß die Chemosensitivität von Zellen solider Tumoren in vitro mit der Aktivierung des CD95-Systems zusammenhängt (Fulda et al., 1998). Speziell für Leberzellen erhielten Müller et al. das Ergebnis einer Zytostatika-induzierten Apoptose über das CD95 Rezeptor-Liganden-System (Müller et al., 1997).

Mit Hilfe Survivin-transfizierter HepG2-Zellen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluß eine Survivin-Expression auf den Apoptose-induzierenden Effekt einer Zytostatika-Behandlung hat. Im Vergleich dazu wurden zusätzlich die Spleißvarianten von Survivin getestet, deren Wirkmechanismus bislang unbekannt ist. Für keines der angewandten Zytostatika (Colchicin, Topotecan und Etoposid) konnte jedoch - im Gegensatz zur Methotrexat-induzierten Apoptose, bei der eine Inhibition gezeigt wurde (Mahotka et al., 1999) - eine Hemmung der Zytostatika-induzierten Apoptose durch Survivin und Survivin- Δ Ex3 nachgewiesen werden. Lediglich für Survivin-2B ergab sich stets ein anti-apoptotischer Effekt. Die verschiedenen Survivin-Varianten scheinen demnach in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Zytostatikums ganz unterschiedliche Effekte zu entfalten.

Die Beobachtung der fehlenden anti-apoptotischen Wirkung von Survivin in unserem HepG2-Tumormodell deckt sich mit einigen anderen Berichten in der Literatur, die hinsichtlich der anti-apoptotischen Funktion von Survivin bereits einige Einschränkungen gemacht haben.

So korreliert im hepatozellulären Karzinom eine Survivin-Expression mit dem Proliferations-, nicht aber signifikant mit dem Apoptoseindex (Ito et al., 2000). Im Vergleich zu anderen IAPs wirkt Survivin nur schwach anti-apoptotisch (Wright et al., 2000). Hinzu kommt, daß von Suzuki et al. im Rahmen der anti-apoptotischen Funktion von Survivin eine Survivin-Translokation in den Zellkern mit nachfolgender Interaktion mit Cdk4 beschrieben wurde (Suzuki et al., 2000b). Deshalb könnte sich die fehlende anti-apoptotische Wirkung von Survivin in unserem Tumormodell durch eine gestörte Translokation von Survivin in den Zellkern erklären, wie dies unsere Immunfluoreszenzuntersuchung gezeigt hat (s. Abb. 23).

Eine andere Erklärung bietet die Beobachtung von Skoufias et al. (2000) an: hier konnte keine Assoziation von Survivin an Mikrotubuli nachwiesen werden, sondern sie beschrieben Survivin als ein Zentromer-assoziiertes Passenger-Protein. Später wurde diese Feststellung von zwei weiteren Arbeitsgruppen unterstützt, die Survivin als „chromosomal passenger protein“ ohne direkte anti-apoptotische Wirkung einordneten. Vielmehr wurde hier beobachtet, daß

sich Survivin in Assoziation mit INCENP und der Aurora-B Kinase während der Mitose von den Zentromeren zur Spindelmittelzone bewegt (Adams et al., 2001; Wheatley et al., 2001).

Zusätzlich beachtet werden müssen Zytostatika-spezifische Effekte:

- Speziell für *Colchicin* konnten Li et al. (1998) zeigen, daß eine Spaltung der Mikrotubuli durch Colchicin zu einer Dispersion von Survivin zwischen Metaphase-Chromosomen führt. Ist die Assoziation von Survivin an Mikrotubuli der Mitosespindel gestört, erhöht sich die Aktivität der Caspase-3 signifikant (Li et al., 1998) und die Apoptose wird eingeleitet. Ein anti-apoptotischer Effekt von Survivin auf Colchicin-behandelte Zellen wäre deshalb nicht zu erwarten und wurde in unseren Versuchen auch nicht beobachtet.
- Der fehlende anti-apoptotische Effekt von Survivin auf eine *Topotecan*-induzierte Apoptose könnte sich daraus erklären, daß Survivin den Anteil der Zellen in der S-Phase steigert. Da die S-Phase-Population den Angriffspunkt für Topoisomerase-Hemmer darstellt, wird die Zielpopulation für dieses Zytostatikum durch Survivin sogar vergrößert. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß Survivin-transfizierte Zellen nach Behandlung mit Camptothecin – ebenfalls ein Topoisomerase-Hemmer – die, im Vergleich mit anderen IAPs, höchste Apoptosefrequenz aufwiesen (Wright et al., 2000).
- Die Inhibition der Topoisomerase II durch *Etoposid* hat eine DNA-Schädigung und nachfolgende Freisetzung von Cytochrom c, Aktivierung DEVD-spaltender Caspasen und Apoptose zur Folge (Dubrez et al., 1995; Jiang and Wu, 1999; Liu, 1989; Martins et al., 1997). Obwohl in einigen Tumormodellen gezeigt wurde, daß Survivin die Apoptosefrequenz und Caspase-Aktivität in Etoposid-behandelten Zellen hemmen kann (Tamm et al., 1998) und daß Antisense-Survivin die Etoposid-Sensitivität steigert (Olie et al., 2000), muß auch hier berücksichtigt werden, daß Survivin den S-Phasen-Anteil einer Zellpopulation erhöht (Suzuki et al., 2000) und damit das potentielle Target für den Topoisomerase-Hemmer Etoposid. Pro- und anti-apoptotische Effekte von Survivin könnten sich deshalb in unserem Versuch die Waage gehalten haben. In diesem Zusammenhang könnte auch von Bedeutung sein, daß von Suzuki et al. eine Bindung von Survivin an Cdk4 nachgewiesen wurde. Durch eine kompetitive Interaktion von Survivin mit dem Cdk4-p21-Komplex, wird p21 freigesetzt und bindet an mitochondriale Procaspase-3, um so die Apoptose zu inhibieren (Suzuki et al., 2000b). Dieser anti-apoptotische Mechanismus von Survivin könnte von Etoposid umgangen werden. So weiß man, daß dieses Zytostatikum eine Caspase-abhängige proteolytische Spaltung von p21 verursacht (Li et al., 1999), so daß möglicherweise nicht mehr hinreichend p21 für eine Procaspase-3-Hemmung zur Verfügung steht.

5.2 Caspase-Interaktion

„...*survivin inhibits caspase activity...*“ (Tamm et al., 1998)
contra
“*Survivin does not inhibit caspase-3 activity*” (Banks et al., 2000)

Der Apoptose-hemmende Effekt von Survivin soll u.a. auf einer Bindung und Inhibition der aktiven Formen von Caspase-3 und -7 beruhen (Tamm et al., 1998). Inzwischen wird jedoch die Interaktion mit diesen Caspasen kontrovers diskutiert (Banks et al., 2000), so daß wir mit in vitro- und in vivo-Assays der Frage einer möglichen Caspasen-Interaktion weiter nachgegangen sind.

5.2.1 Caspase-Interaktion in vitro

In vitro wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen eine Interaktion von Survivin mit Caspase-3 untersucht. Die Beobachtungen waren jedoch unterschiedlich:

Von Shin et al. wurde eine direkte Caspase-3-Inhibition für eine PARP und Ac-DEVD-AMC – Spaltung gezeigt, allerdings nur nach 20-minütiger Vorinkubation des Ansatzes vor Zugabe des Caspase-3-Substratgemisches bei 25 °C (Shin et al., 2001). Nach Mischen der Proteine im zellfreien System konnte über Immunoblotting eine Interaktion nachgewiesen werden (Suzuki et al., 2000b). Eine Survivin-Mutante oder antisense-Behandlung bewirkte eine erhöhte Spaltungsaktivität von Caspase-3 für Ac-DEVD-AMC (Li et al., 1999).

Auf der anderen Seite konnte im Vergleich zur Positiv-Kontrolle XIAP keine Hemmung für eine DEVD-AMC-Spaltung festgestellt werden (Banks et al., 2000). Verdecia et al. fanden keine Bedingungen für das Substrat Z-DEVD-AFC, bei denen Survivin zu einer meßbaren Inhibition der Caspase-3 führte, und auch bei „in vitro binding assays“ mit anschließender Immunpräzipitation gab es keinen Anhalt für eine Interaktion (Verdecia et al., 2000).

Auch im Caspase-3-Aktivitätstest unserer Untersuchung konnte die Caspase-3-Aktivität durch die verschiedenen Survivin-Proteine im Vergleich zur Positiv-Kontrolle XIAP-BIR 2/3 nicht gehemmt werden. Obwohl die Caspase-hemmende Wirkung von Survivin durch Bindung an Tubulin gesteigert werden soll (Li et al., 1998), konnten wir die Caspase-3-Aktivität weder durch Zugabe von unverändertem Tubulin (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe), noch durch Taxol-stabilisiertes Tubulin beeinflussen. Hierbei muß jedoch ausdrücklich erwähnt werden, daß die von Li et al. als Voraussetzung für eine Caspase-3-Hemmung postulierte

Mikrotubuli-Interaktion ebenfalls umstritten ist und z.B. von einer anderen Arbeitsgruppe verneint wird (Skoufias et al., 2000).

Obwohl Tamm et al. (1998) die Ko-Immünpräzipitation benutzten, um die Interaktion von Survivin mit aktiver Caspase-3 und -7 zu zeigen, konnten wir dies in unseren Ko-Immünpräzipitations-Experimenten nicht reproduzieren. Dies könnte aber mit der geringen Sensitivität dieser Methode zusammenhängen. So konnten auch Suzuki et al. im zellfreien System mittels Immunoblotting eine Interaktion mit Caspase-3 nachweisen, während ihnen dies mit dem Verfahren der Immünpräzipitation nicht gelang (Suzuki et al., 2000b).

5.2.2 Caspase-Interaktion in vivo

Das CheckMate Mammalian Two-Hybrid System ist ein sehr sensibles Verfahren zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in vivo (Fields und Song, 1989). Wir haben deshalb dieses System benutzt, um Interaktionen von Survivin mit Procaspase-3 und seinen Untereinheiten nachweisen zu können. Speziell die Untereinheiten stellen die aktive Form der Caspasen dar, die von Tamm et al. als Bindungspartner von Survivin identifiziert wurden. Allerdings fanden wir mit dieser Methode keine Hinweise auf eine derartige Interaktion - zumindest nicht in unserem HepG2- und COS-7-Modell.

Eine mögliche Erklärung für den nicht gelungenen Nachweis einer Interaktion wäre, daß die N-terminalen Interaktionsdomänen der Proteine (VP16 und GAL4) einen Störfaktor bei der Interaktion zwischen Survivin und den Caspasen darstellen. Zusätzlich könnte auch die Richtung, in der die Interaktion erfolgt, die Assoziation der beiden Einheiten GAL4 und VP16 verhindern (s. Abb. 24).

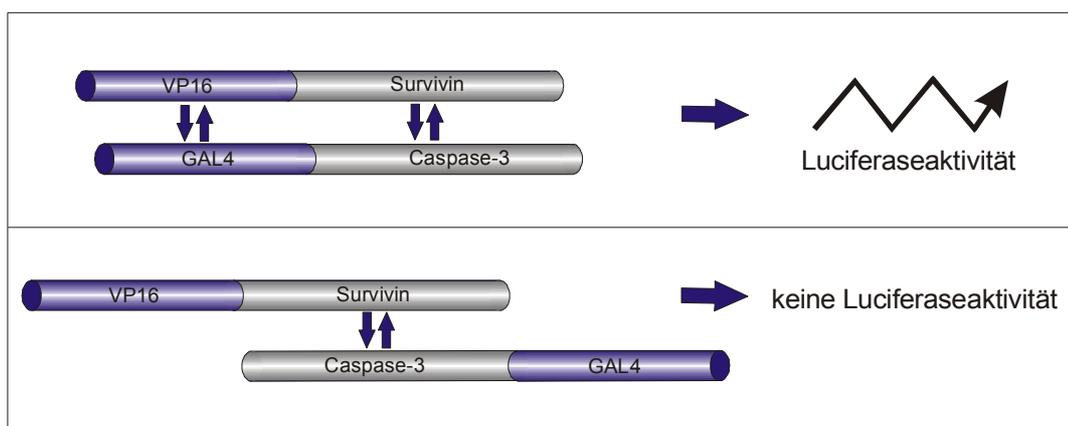


Abb. 24 Möglichkeiten der Survivin-Caspase-Interaktion und Assoziation der Interaktionsdomänen

Eine Interaktion zwischen Survivinen und den Caspasen wäre sowohl in die eine als auch in die andere Richtung denkbar. Die Richtung verändert jedoch die Möglichkeit einer Assoziation zwischen den Interaktionsdomänen VP16 und GAL4, die für die Aktivierung des Luciferase-Promotors notwendig ist.

Obwohl wir in unseren Untersuchungen die Ergebnisse von Tamm et al. nicht reproduzieren konnten, bestätigte die Arbeitsgruppe von Shin et al. die Beobachtungen von Tamm et al.: So wurde mittels „surface plasmon resonance spectroscopy“ eine Bindung zwischen den Proteinen Survivin und Caspase-3 und -7 in Lösung nachgewiesen. Zusätzlich wurde in vitro für Survivin eine Inhibition der PARP (= poly (ADP-ribose) polymerase) – Spaltungsaktivität von Caspase-3 und -7 gezeigt (Shin et al., 2001).

Dennoch sollte in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, daß möglicherweise keine *direkte* Bindung von Survivin an Caspasen stattfindet: So fehlt bei Survivin die Linker-Region aufwärts der zweiten BIR-Domäne, die von anderen IAP-Proteinen, z.B. XIAP, benötigt wird, um an die aktive Caspase-3 zu binden (Banks et al., 2000). Das Survivin-Protein weist auch keine CARD (= caspase recruitment domain) – Domäne auf (Chantalat et al., 2000), die bei verschiedenen IAP-Proteinen mit der Caspase-Bindung in Verbindung gebracht wird. Mutationsanalysen von XIAP zeigten, daß sich die für eine Caspase-3-Inhibition wichtigsten Abschnitte in einer Schleife N-terminal zur BIR2-Domäne von XIAP finden. Diese N-terminale Verlängerung fehlt bei Survivin, das aus diesem Grund möglicherweise kein effektiver *direkter* Caspase-Inhibitor sein kann (Verdecia et al., 2000).

5.3 Dimerisation von Survivin

Die kristalline Struktur von humanem Survivin wurde mit Hilfe der MAD (= **m**ultiple **a**nomalous **d**ispersion method) untersucht und von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen als Dimer beschrieben (Chantalat et al., 2000; Verdecia et al., 2000). Die Interaktion der beiden Survivin-Monomere beruht dabei auf Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Kräften zwischen dem N-terminalen Ende, der Linker-Region und dem N-Terminus der vierten α -Helix der Proteine. Diese Dimer-Formation wurde nicht nur bei humanem Survivin, sondern auch bei Survivin der Maus beobachtet (Muchmore et al., 2000).

Da das Two-Hybrid System ein sensitives Verfahren für Protein-Protein-Interaktionen ist, wurde es in dieser Arbeit auch zur Detektion einer möglichen Wechselbeziehung von Survivin mit sich selbst und mit seinen Spleißvarianten angewandt. Insbesondere in Hinsicht auf eine mögliche Inhibition der Wirkung von Survivin durch Bindung der Spleißvarianten, stellte eine solche Interaktionsuntersuchung eine wichtige Fragestellung dar. Ein Interaktionsnachweis gelang uns jedoch weder für Survivin mit sich selbst, noch mit seinen Spleißvarianten.

Bei der Beurteilung der Aussagekraft dieses Ergebnisses müssen allerdings mindestens zwei mögliche Störfaktoren berücksichtigt werden: Die Strukturdaten zeigen, daß vorwiegend die N-terminale Region von Survivin an der Dimer-Bildung beteiligt ist (Chantalat et al., 2000). Die zur Interaktionsdetektion notwendigen Domänen VP16 und GAL4 befinden sich ebenfalls N-terminal der Survivin-Konstrukte, was die Wahrscheinlichkeit für eine Behinderung der Survivin-Interaktion deutlich erhöht. Ebenso besteht die Möglichkeit einer Selbstassoziation: Binden Survivin-Proteine aus dem gleichen Vektor aneinander, so assoziieren auch gleiche Interaktionsdomänen (GAL4 mit GAL4 und VP16 mit VP16). Bei einer solchen Homodimerbildung kann der Promotor der Luciferase nicht aktiviert werden und man erhält kein meßbares Signal für eine Interaktion. Nur bei Assoziation von Survivin-Proteinen mit unterschiedlichen Interaktionsdomänen kommt es zu einer erhöhten Luciferaseaktivität (s. Abb. 25).

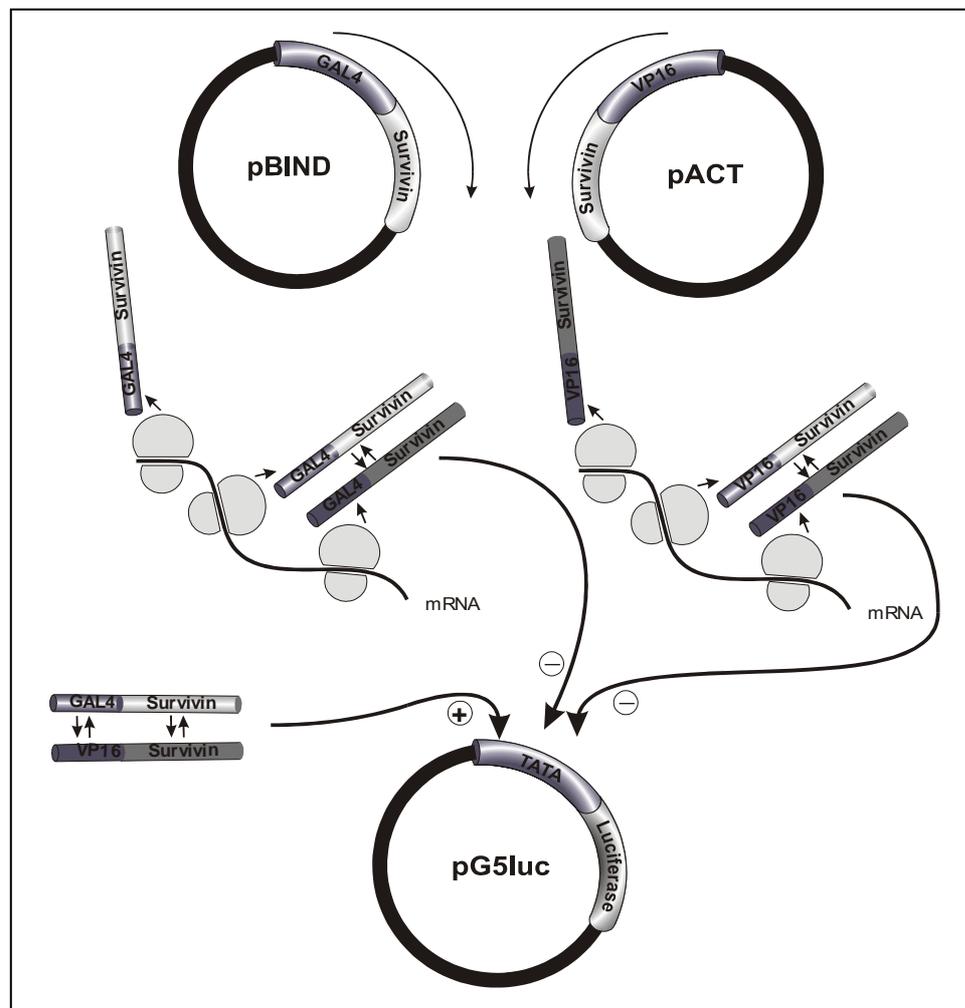


Abb. 25 Möglichkeit der Selbstassoziation

Bei der Bindung von zwei Survivin-Molekülen kann es sowohl zu einer Hetero- als auch zur Homodimerbildung kommen. Im Fall der Heterodimerbildung assoziieren unterschiedliche Interaktionsdomänen und der Luciferasepromotor wird aktiviert (links). Es kann jedoch auch zur Bindung von Survivin-Proteinen mit gleichen Interaktionsdomänen kommen. Hier wird der Promotor des pG5luc-Vektors nicht aktiviert und es findet keine meßbare Luciferaseexpression statt (oben).

5.4 Subzelluläre Lokalisation von Survivin nach Zytostatika-Behandlung

Da die Lokalisation von Proteinen einen wichtigen Hinweis auf ihre Funktion innerhalb der Zelle gibt, wurden bereits zahlreiche Untersuchungen zur Lokalisation von Survivin gemacht. So spielt beim Magen-Karzinom eine Kernlokalisierung von Survivin möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, da die Kernlokalisierung von Survivin signifikant mit einer besseren Prognose einhergeht als eine zytoplasmatische Lokalisation von Survivin (Okada et al., 2001). Spätere Untersuchungen zur Lokalisation von Survivin haben durch quantitative subzelluläre Fraktionierung gezeigt, daß Survivin im Verhältnis von 1:6 nukleär:zytosolisch im Grundzustand vorliegt. Die Art der Lokalisation und Funktion von Survivin hängt dabei mit der Phosphorylierung von Thr(34) durch die p34(cdc2)-Kinase ab (Fortugno et al., 2002). Suzuki et al. konnten zeigen, daß Survivin während der Einleitung der Apoptose auch in den Zellkern transloziert, um dort mit der Zellzyklus-abhängigen-Kinase Cdk4 zu interagieren (Suzuki et al., 2000b). Eine vergleichbare Translokation von Survivin fand durch die Zytostatika-Behandlung mit Colchicin, Topotecan und Etoposid nicht statt, was möglicherweise darauf hindeuten könnte, daß Survivin die Apoptose, die durch diese drei Zytostatika induziert wird, nicht inhibieren kann.

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung einer Apoptoseresistenz ist einer der wichtigsten Faktoren für Progression und Therapieresistenz maligner Tumoren. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Apoptose-Inhibitor Survivin ist ein in Tumoren stark überexprimiertes Protein, von dem kürzlich zwei alternative Spleißvarianten entdeckt wurden (Survivin-2B und Survivin- Δ Ex3).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, die Bedeutung der verschiedenen Survivin-Varianten für eine Zytostatika-induzierte Apoptose zu überprüfen und zusätzlich Aufschluß über die Art und subzelluläre Lokalisation möglicher Interaktionspartner zu gewinnen:

- Um den Einfluß der verschiedenen Survivin-Varianten auf die Zytostatikaresistenz zu überprüfen, wurden zunächst HepG2-Zellen mit den Survivin-Varianten transfiziert und mit drei unterschiedlichen Zytostatika (Colchicin, Topotecan und Etoposid) behandelt. Hierbei ergaben sich lediglich für Survivin-2B, nicht jedoch für Survivin und Survivin- Δ Ex3 anti-apoptotische Effekte im HepG2-Tumormodell. Interessanterweise war zuvor im gleichen Modellsystem nach Methotrexat-Exposition für Survivin und Survivin- Δ Ex3 eine anti-apoptotische Wirkung und für Survivin-2B keine anti-apoptotische Wirkung nachgewiesen worden (Mahotka et al., 2002). Die verschiedenen Survivin-Varianten scheinen demnach in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Zytostatikums ganz unterschiedliche Effekte zu entfalten.
- Im Zusammenhang mit der Apoptose-Inhibition von Survivin wird in der Literatur eine kontroverse Diskussion über die Interaktion mit Caspase-3 und -7 geführt. Diese mögliche Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen *in vitro* mittels eines Caspase-3-Aktivitätstestes und einer Ko-Immunpräzipitation, aber auch *in vivo* mit Hilfe des CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid Systems überprüft. Sowohl unsere *in vitro* als auch *in vivo* erhobenen Daten deuteten auf eine fehlende *direkte* Interaktion zwischen den verschiedenen Survivin-Varianten und Caspase-3 und -7 in unserem Modellsystem hin.
- Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, daß Survivin-Protein wahrscheinlich als Dimer wirksam wird. Um Survivin *in vivo* auf eine Interaktion mit sich selbst und mit seinen Spleißvarianten zu testen, wurde auch hier das CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System angewendet. Eine Assoziation mit den Spleißvarianten könnte dabei eine zusätzliche Regulationsmöglichkeit der Apoptose eröffnen. Mit Hilfe dieser Methode konnte jedoch keine Homo- bzw. Heterodimerbildung der verschiedenen Survivin-Varianten nachgewiesen werden.
- Die subzelluläre Lokalisation von Survivin kann für seine Funktion und möglicherweise auch für die Prognose von Tumoren von Bedeutung sein. In der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 konnte bereits nachgewiesen werden, daß sich Survivin und Survivin-2B vorwiegend im Zytoplasma und Survivin- Δ Ex3 hauptsächlich im Kern befinden. In dieser Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, daß dieses Verteilungsmuster auch nach Zytostatikabehandlung beibehalten wurde.

7 Literaturverzeichnis

- Adams,R.R., Carmena,M., and Earnshaw,W.C. (2001). Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* *11*, 49-54.
- Adida,C., Haioun,C., Gaulard,P., Lepage,E., Morel,P., Briere,J., Dombret,H., Reyes,F., Diebold,J., Gisselbrecht,C., Salles,G., Altieri,D.C., and Molina,T.J. (2000a). Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* *96*, 1921-1925.
- Adida,C., Recher,C., Raffoux,E., Daniel,M.T., Taksin,A.L., Rousselot,P., Sigaux,F., Degos,L., Altieri,D.C., and Dombret,H. (2000b). Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* *111*, 196-203.
- Altieri,D.C., Marchisio,P.C., and Marchisio,C. (1999). Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* *79*, 1327-1333.
- Ambrosini,G., Adida,C., and Altieri,D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* *3*, 917-921.
- Andersen,M.H., Pedersen,L.O., Becker,J.C., and Straten,P.T. (2001). Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* *61*, 869-872.
- Banks,D.P., Plescia,J., Altieri,D.C., Chen,J., Rosenberg,S.H., Zhang,H., and Ng,S.C. (2000). Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* *96*, 4002-4003.
- Birnbaum,M.J., Clem,R.J., and Miller,L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J. Virol.* *68*, 2521-2528.
- Bishop,J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* *64*, 235-248.
- Chakravarti,A., Noll,E., Black,P.M., Finkelstein,D.F., Finkelstein,D.M., Dyson,N.J., and Loeffler,J.S. (2002). Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J. Clin. Oncol.* *20*, 1063-1068.
- Chantalat,L., Skoufias,D.A., Kleman,J.P., Jung,B., Dideberg,O., and Margolis,R.L. (2000). Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol. Cell* *6*, 183-189.
- Chen,J., Wu,W., Tahir,S.K., Kroeger,P.E., Rosenberg,S.H., Cowsert,L.M., Bennett,F., Krajewski,S., Krajewska,M., Welsh,K., Reed,J.C., and Ng,S.C. (2000). Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia.* *2*, 235-241.
- Chiodino,C., Cesinaro,A.M., Ottani,D., Fantini,F., Giannetti,A., Trentini,G.P., and Pincelli,C. (1999). Communication: expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. *J. Invest Dermatol.* *113*, 415-418.
- Choi,N., Baumann,M., Flentjie,M., Kellokumpu-Lehtinen,P., Senan,S., Zamboglou,N., and Kosmidis,P. (2001). Predictive factors in radiotherapy for non-small cell lung cancer: present status. *Lung Cancer* *31*, 43-56.
- Crook,N.E., Clem,R.J., and Miller,L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* *67*, 2168-2174.
- DePinho,R.A. (2000). The age of cancer. *Nature* *408*, 248-254.
- Dubrez,L., Goldwasser,F., Genne,P., Pommier,Y., and Solary,E. (1995). The role of cell cycle regulation and apoptosis triggering in determining the sensitivity of leukemic cells to topoisomerase I and II inhibitors. *Leukemia* *9*, 1013-1024.
- Fields,S. and Song,O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245-246.

- Fortugno,P., Wall,N.R., Giodini,A., O'Connor,D.S., Plescia,J., Padgett,K.M., Tognin,S., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (2002). Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J. Cell Sci.* *115*, 575-585.
- Fulda,S., Los,M., Friesen,C., and Debatin,K.M. (1998). Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int. J. Cancer* *76*, 105-114.
- Gianani,R., Jarboe,E., Orlicky,D., Frost,M., Bobak,J., Lehner,R., and Shroyer,K.R. (2001). Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum. Pathol.* *32*, 119-125.
- Grossman,D., Kim,P.J., Schechner,J.S., and Altieri,D.C. (2001). Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 635-640.
- Grossman,D., McNiff,J.M., Li,F., and Altieri,D.C. (1999a). Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J. Invest Dermatol.* *113*, 1076-1081.
- Grossman,D., McNiff,J.M., Li,F., and Altieri,D.C. (1999b). Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest* *79*, 1121-1126.
- Hanahan,D., Jessee,J., and Bloom,F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* *204*, 63-113.
- Hengartner,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* *407*, 770-776.
- Holter,W., Fordis,C.M., and Howard,B.H. (1989). Efficient gene transfer by sequential treatment of mammalian cells with DEAE-dextran and deoxyribonucleic acid. *Exp. Cell Res.* *184*, 546-551.
- Ikeguchi,M., Ueda,T., Sakatani,T., Hirooka,Y., and Kaibara,N. (2002). Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn. Mol. Pathol.* *11*, 33-40.
- Islam,A., Kageyama,H., Takada,N., Kawamoto,T., Takayasu,H., Isogai,E., Ohira,M., Hashizume,K., Kobayashi,H., Kaneko,Y., and Nakagawara,A. (2000). High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* *19*, 617-623.
- Ito,T., Shiraki,K., Sugimoto,K., Yamanaka,T., Fujikawa,K., Ito,M., Takase,K., Moriyama,M., Kawano,H., Hayashida,M., Nakano,T., and Suzuki,A. (2000). Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *31*, 1080-1085.
- Jaattela,M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* *248*, 30-43.
- Jiang,Z.H. and Wu,J.Y. (1999). Alternative splicing and programmed cell death. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *220*, 64-72.
- Kamihira,S., Yamada,Y., Hirakata,Y., Tomonaga,M., Sugahara,K., Hayashi,T., Dateki,N., Harasawa,H., and Nakayama,K. (2001). Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. *Br. J. Haematol.* *114*, 63-69.
- Kanwar,J.R., Shen,W.P., Kanwar,R.K., Berg,R.W., and Krissansen,G.W. (2001). Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7- 1 immunogene therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 1541-1552.
- Kappler,M., Kohler,T., Kampf,C., Diestelkotter,P., Wurl,P., Schmitz,M., Bartel,F., Lautenschlager,C., Rieber,E.P., Schmidt,H., Bache,M., Taubert,H., and Meyer,A. (2001). Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int. J. Cancer* *95*, 360-363.
- Kato,J., Kuwabara,Y., Mitani,M., Shinoda,N., Sato,A., Toyama,T., Mitsui,A., Nishiwaki,T., Moriyama,S., Kudo,J., and Fujii,Y. (2001). Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int. J. Cancer* *95*, 92-95.

- Kawasaki,H., Toyoda,M., Shinohara,H., Okuda,J., Watanabe,I., Yamamoto,T., Tanaka,K., Tenjo,T., and Tanigawa,N. (2001). Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 91, 2026-2032.
- Konno,R., Yamakawa,H., Utsunomiya,H., Ito,K., Sato,S., and Yajima,A. (2000). Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 529-534.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Li,F., Ackermann,E.J., Bennett,C.F., Rothermel,A.L., Plescia,J., Tognin,S., Villa,A., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* 1, 461-466.
- Li,F. and Altieri,D.C. (1999). Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem. J.* 344 Pt 2, 305-311.
- Li,F., Ambrosini,G., Chu,E.Y., Plescia,J., Tognin,S., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-584.
- Liu,L.F. (1989). DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 351-375.
- Lo,M.L., Staibano,S., Pannone,G., Mignogna,M.D., Mariggio,A., Salvatore,G., Chieffi,P., Tramontano,D., De Rosa,G., and Altieri,D.C. (2001). Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 249-254.
- Mahotka,C., Liebmann,J., Wenzel,M., Suschek,C.V., Schmitt,M., Gabbert,H.E., and Gerharz,C.D. (2002). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death. Differ.* 9, 1334-1342.
- Mahotka,C., Wenzel,M., Springer,E., Gabbert,H.E., and Gerharz,C.D. (1999). Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.* 59, 6097-6102.
- Martins,L.M., Kottke,T., Mesner,P.W., Basi,G.S., Sinha,S., Frigon,N., Jr., Tatar,E., Tung,J.S., Bryant,K., Takahashi,A., Svingen,P.A., Madden,B.J., McCormick,D.J., Earnshaw,W.C., and Kaufmann,S.H. (1997). Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 7421-7430.
- Mesri,M., Morales-Ruiz,M., Ackermann,E.J., Bennett,C.F., Pober,J.S., Sessa,W.C., and Altieri,D.C. (2001). Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am. J. Pathol.* 158, 1757-1765.
- Miller,M., Smith,D., Windsor,A., and Kessler,A. (2001). Survivin gene expression and prognosis in recurrent colorectal cancer. *Gut* 48, 137-138.
- Monzo,M., Rosell,R., Felip,E., Astudillo,J., Sanchez,J.J., Maestre,J., Martin,C., Font,A., Barnadas,A., and Abad,A. (1999). A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J. Clin. Oncol.* 17, 2100-2104.
- Moore,M. (2001). Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *J. Insur. Med.* 33, 202-203.
- Mori,N., Yamada,Y., Hata,T., Ikeda,S., Yamasaki,Y., Tomonaga,M., and Yamamoto,N. (2001). Expression of survivin in HTLV-I-infected T-cell lines and primary ATL cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1110-1113.
- Moriai,R., Asanuma,K., Kobayashi,D., Yajima,T., Yagihashi,A., Yamada,M., and Watanabe,N. (2001). Quantitative analysis of the anti-apoptotic gene survivin expression in malignant haematopoietic cells. *Anticancer Res.* 21, 595-600.

- Muchmore,S.W., Chen,J., Jakob,C., Zakula,D., Matayoshi,E.D., Wu,W., Zhang,H., Li,F., Ng,S.C., and Altieri,D.C. (2000). Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol. Cell* 6, 173-182.
- Muller,M., Strand,S., Hug,H., Heinemann,E.M., Walczak,H., Hofmann,W.J., Stremmel,W., Krammer,P.H., and Galle,P.R. (1997). Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest* 99, 403-413.
- O'Connor,D.S., Grossman,D., Plescia,J., Li,F., Zhang,H., Villa,A., Tognin,S., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (2000a). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13103-13107.
- O'Connor,D.S., Schechner,J.S., Adida,C., Mesri,M., Rothermel,A.L., Li,F., Nath,A.K., Pober,J.S., and Altieri,D.C. (2000b). Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 156, 393-398.
- Okada,E., Murai,Y., Matsui,K., Isizawa,S., Cheng,C., Masuda,M., and Takano,Y. (2001). Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett.* 163, 109-116.
- Olie,R.A., Simoes-Wust,A.P., Baumann,B., Leech,S.H., Fabbro,D., Stahel,R.A., and Zangemeister-Wittke,U. (2000). A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.* 60, 2805-2809.
- Papapetropoulos,A., Fulton,D., Mahboubi,K., Kalb,R.G., O'Connor,D.S., Li,F., Altieri,D.C., and Sessa,W.C. (2000). Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 9102-9105.
- Phizicky,E.M. and Fields,S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 59, 94-123.
- Reed,J.C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 17, 2941-2953.
- Rodriguez,J.A., Span,S.W., Ferreira,C.G., Kruyt,F.A., and Giaccone,G. (2002). CRM1-Mediated Nuclear Export Determines the Cytoplasmic Localization of the Antiapoptotic Protein Survivin. *Exp. Cell Res.* 275, 44-53.
- Rohayem,J., Diestelkoetter,P., Weigle,B., Oehmichen,A., Schmitz,M., Mehlhorn,J., Conrad,K., and Rieber,E.P. (2000). Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 60, 1815-1817.
- Rudin,C.M. and Thompson,C.B. (1997). Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.* 48, 267-281.
- Sadowski,I., Ma,J., Triezenberg,S., and Ptashne,M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Sandler,A., Scott,D., Azuhata,T., Takamizawa,S., and O'Dorisio,S. (2002). The survivin:Fas ratio is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* 37, 507-511.
- Sanger,F. and Coulson,A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94, 441-448.
- Sarela,A.I., Macadam,R.C., Farmery,S.M., Markham,A.F., and Guillou,P.J. (2000). Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 46, 645-650.
- Sarela,A.I., Scott,N., Ramsdale,J., Markham,A.F., and Guillou,P.J. (2001). Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* 8, 305-310.
- Satoh,K., Kaneko,K., Hirota,M., Masamune,A., Satoh,A., and Shimosegawa,T. (2001). Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 92, 271-278.

- Scaffidi,C., Fulda,S., Srinivasan,A., Friesen,C., Li,F., Tomaselli,K.J., Debatin,K.M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* *17*, 1675-1687.
- Sharp,J.D., Hausladen,D.A., Maher,M.G., Wheeler,M.A., Altieri,D.C., and Weiss,R.M. (2002). Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. *Front Biosci.* *7*, e36-e41.
- Shin,S., Sung,B.J., Cho,Y.S., Kim,H.J., Ha,N.C., Hwang,J.I., Chung,C.W., Jung,Y.K., and Oh,B.H. (2001). An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* *40*, 1117-1123.
- Silke,J. and Vaux,D.L. (2001). Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J. Cell Sci.* *114*, 1821-1827.
- Skoufias,D.A., Mollinari,C., Lacroix,F.B., and Margolis,R.L. (2000). Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J. Cell Biol.* *151*, 1575-1582.
- Smith,S.D., Wheeler,M.A., Plescia,J., Colberg,J.W., Weiss,R.M., and Altieri,D.C. (2001). Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA* *285*, 324-328.
- Suzuki,A., Hayashida,M., Ito,T., Kawano,H., Nakano,T., Miura,M., Akahane,K., and Shiraki,K. (2000a). Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* *19*, 3225-3234.
- Suzuki,A., Ito,T., Kawano,H., Hayashida,M., Hayasaki,Y., Tsutomi,Y., Akahane,K., Nakano,T., Miura,M., and Shiraki,K. (2000b). Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* *19*, 1346-1353.
- Swana,H.S., Grossman,D., Anthony,J.N., Weiss,R.M., and Altieri,D.C. (1999). Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N. Engl. J. Med.* *341*, 452-453.
- Tajiri,T., Tanaka,S., Shono,K., Kinoshita,Y., Fujii,Y., Suita,S., Ihara,K., and Hara,T. (2001). Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett.* *166*, 89-94.
- Takamizawa,S., Scott,D., Wen,J., Grundy,P., Bishop,W., Kimura,K., and Sandler,A. (2001). The survivin:fas ratio in pediatric renal tumors. *J. Pediatr. Surg.* *36*, 37-42.
- Tamm,I., Wang,Y., Sausville,E., Scudiero,D.A., Vigna,N., Oltersdorf,T., and Reed,J.C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* *58*, 5315-5320.
- Tanaka,K., Iwamoto,S., Gon,G., Nohara,T., Iwamoto,M., and Tanigawa,N. (2000). Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* *6*, 127-134.
- Tran,J., Master,Z., Yu,J.L., Rak,J., Dumont,D.J., and Kerbel,R.S. (2002). A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 4349-4354.
- Tran,J., Rak,J., Sheehan,C., Saibil,S.D., LaCasse,E., Korneluk,R.G., and Kerbel,R.S. (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *264*, 781-788.
- Vaux,D.L. and Korsmeyer,S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* *96*, 245-254.
- Velculescu,V.E., Madden,S.L., Zhang,L., Lash,A.E., Yu,J., Rago,C., Lal,A., Wang,C.J., Beaudry,G.A., Ciriello,K.M., Cook,B.P., Dufault,M.R., Ferguson,A.T., Gao,Y., He,T.C., Hermeking,H., Hiraldo,S.K., Hwang,P.M., Lopez,M.A., Luderer,H.F., Mathews,B., Petroziello,J.M., Polyak,K., Zawel,L., Kinzler,K.W., and . (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nat. Genet.* *23*, 387-388.
- Verdecia,M.A., Huang,H., Dutil,E., Kaiser,D.A., Hunter,T., and Noel,J.P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 602-608.
- Wheatley,S.P., Carvalho,A., Vagnarelli,P., and Earnshaw,W.C. (2001). INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr. Biol.* *11*, 886-890.

Wright,M.E., Han,D.K., and Hockenbery,D.M. (2000). Caspase-3 and inhibitor of apoptosis protein(s) interactions in *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *FEBS Lett.* *481*, 13-18.

Wurl,P., Kappler,M., Meye,A., Bartel,F., Kohler,T., Lautenschlager,C., Bache,M., Schmidt,H., and Taubert,H. (2002). Co-expression of survivin and TERT and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Lancet* *359*, 943-945.

Yoshida,H., Ishiko,O., Sumi,T., Matsumoto,Y., and Ogita,S. (2001). Survivin, bcl-2 and matrix metalloproteinase-2 enhance progression of clear cell- and serous-type ovarian carcinomas. *Int. J. Oncol.* *19*, 537-542.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. C. D. Gerharz für das Angebot dieser Arbeit, die kompetente Betreuung und ständige Präsenz bei der Besprechung von Problemen danken.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an meinen Betreuer Dr. C. Mahotka. Er begleitete mich während der gesamten Zeit dieser Arbeit, hatte immer ein offenes Ohr und unterstützte mich wo es nur möglich war. Durch seine professionellen Ratschläge und sein enormes molekularbiologisches Hintergrundwissen wurden so manche Schwierigkeiten aus dem Weg geräumt.

Bei der Laborarbeit waren mir ebenso Dr. E. Springer durch seine Unterstützung als Biologe und Frau S. Khalil eine große Hilfe.

Für die ausgiebige Unterstützung meines Studiums und meiner Doktorarbeit möchte ich meinen Eltern Maria und Manfred Müller danken. Auch geht ein herzlicher Dank an meine Schwester Corinna Müller.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Maureen Müller
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 21.11.1976
Geburtsort: Mönchengladbach

Schulbildung

6 / 1996 Abitur
1987 bis 1996 Cornelius-Burgh-Gymnasium, Erkelenz
1983 bis 1987 Grundschule, Keyenberg-Erkelenz

Universitätsausbildung

1996 - 2003 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
5 / 2003 3. Teil der Ärztlichen Prüfung
3 / 2002 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
3 / 2000 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
8 / 1998 Ärztliche Vorprüfung

Famulaturen und Praktisches Jahr

4 / 02 - 3 / 2003 **Praktisches Jahr**, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1. Tertial: Innere Medizin, Universität Düsseldorf
Klinik für Hämatologie und Onkologie, Prof. Dr. R. Haas
Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Prof. Dr. B. Grabensee
2. Tertial: Chirurgische Kinderklinik, Inselspital, Universität Bern, Schweiz
Prof. Dr. G. Kaiser
3. Tertial: Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Universität Düsseldorf
Prof. Dr. U. Ganzer
9 / 2001 **Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde**, 1 Monat
Dr. C. Borg, St. Luke`s Hospital, Malta
3 / 2001 **Augenheilkunde**, 2 Wochen
Prof. Dr. R. Sundmacher, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
9 / 2000 **Internistische Notaufnahme**, 1 Monat
Prof. Dr. B. Grabensee, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
8 / 2000 **Gynäkologie und Geburtshilfe**, 2 Wochen
Dr. U. D. Rosseck, Krankenhaus Neuwerk, Mönchengladbach
7 / 2000 **Allgemeinmedizin**, 2 Wochen
Dr. Schumacher, Facharzt für Allgemeinmedizin, Düsseldorf
3 / 2000 **Innere Medizin**, 2 Wochen
Dr. R. W. van Uelft, Krankenhaus Neuwerk, Mönchengladbach
3 / 1999 **Pathologie**, 1 Monat
Prof. Dr. H. E. Gerharz, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Zusatzkurse

1999 / 2000 Grundlagen der CT-, Sonographie- und Farbduplex-Diagnostik
Dr. Hofer, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Nebenarbeit

1998 - 2000 Pflegedienst im Franziskus-Krankenhaus, Mönchengladbach
2000 und 2001 / 02 Assistentin im Kurs für Makroskopische Anatomie und im Kurs für Klinische Chemie

Sprachen

Englisch, (Französisch)

SURVIVIN UND SEINE ALTERNATIVEN SPLEISSVARIANTEN: UNTERSUCHUNGEN ZU IHRER BEDEUTUNG FÜR EINE ZYTOSTATIKA-INDUZIERTE APOPTOSE UND IHREN MOLEKULAREN INTERAKTIONSPARTNERN

Die Entwicklung einer Apoptoresistenz ist einer der wichtigsten Faktoren für Progression und Therapieresistenz maligner Tumoren. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Apoptose-Inhibitor Survivin ist ein in Tumoren stark überexprimiertes Protein, von dem kürzlich zwei alternative Spleißvarianten entdeckt wurden (Survivin-2B und Survivin- Δ Ex3).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, die Bedeutung der verschiedenen Survivin-Varianten für eine Zytostatika-induzierte Apoptose zu überprüfen und zusätzlich Aufschluß über die Art und subzelluläre Lokalisation möglicher Interaktionspartner zu gewinnen:

- Um den Einfluß der verschiedenen Survivin-Varianten auf die Zytostatikaresistenz zu überprüfen, wurden zunächst HepG2-Zellen mit den Survivin-Varianten transfiziert und mit drei unterschiedlichen Zytostatika (Colchicin, Topotecan und Etoposid) behandelt. Hierbei ergaben sich lediglich für Survivin-2B, nicht jedoch für Survivin und Survivin- Δ Ex3 anti-apoptotische Effekte im HepG2-Tumormodell. Interessanterweise war zuvor im gleichen Modellsystem nach Methotrexat-Exposition für Survivin und Survivin- Δ Ex3 eine anti-apoptotische Wirkung und für Survivin-2B keine anti-apoptotische Wirkung nachgewiesen worden (Mahotka et al., 2002). Die verschiedenen Survivin-Varianten scheinen demnach in Abhängigkeit von der Art des eingesetzten Zytostatikums ganz unterschiedliche Effekte zu entfalten.
- Im Zusammenhang mit der Apoptose-Inhibition von Survivin wird in der Literatur eine kontroverse Diskussion über die Interaktion mit Caspase-3 und -7 geführt. Diese mögliche Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen *in vitro* mittels eines Caspase-3-Aktivitätstestes und einer Ko-Immunpräzipitation, aber auch *in vivo* mit Hilfe des CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid Systems überprüft. Sowohl unsere *in vitro* als auch *in vivo* erhobenen Daten deuteten auf eine fehlende *direkte* Interaktion zwischen den verschiedenen Survivin-Varianten und Caspase-3 und -7 in unserem Modellsystem hin.
- Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, daß Survivin-Protein wahrscheinlich als Dimer wirksam wird. Um Survivin *in vivo* auf eine Interaktion mit sich selbst und mit seinen Spleißvarianten zu testen, wurde auch hier das CheckMateTM Mammalian Two-Hybrid System angewandt. Eine Assoziation mit den Spleißvarianten könnte dabei eine zusätzliche Regulationsmöglichkeit der Apoptose eröffnen. Mit Hilfe dieser Methode konnte jedoch keine Homo- bzw. Heterodimerbildung der verschiedenen Survivin-Varianten nachgewiesen werden.
- Die subzelluläre Lokalisation von Survivin kann für seine Funktion und möglicherweise auch für die Prognose von Tumoren von Bedeutung sein. In der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 konnte bereits nachgewiesen werden, daß sich Survivin und Survivin-2B vorwiegend im Zytoplasma und Survivin- Δ Ex3 hauptsächlich im Kern befinden. In dieser Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, daß dieses Verteilungsmuster auch nach Zytostatika-Behandlung beibehalten wurde.