



**Oxidative Modulation zellulärer Signalwege:
Einfluss redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren
auf die Sensitivierung von Krebszellen gegenüber
Doxorubicin und TNF- α**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Regine Lüpertz

aus Neuss

Düsseldorf, November 2008

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R. Kahl

Koreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Zelluläre Signaltransduktion	1
1.1.1 NF- κ B	1
1.1.1.1 NF- κ B Signalwege	2
1.1.1.2 NF- κ B regulierte Zielgene	4
1.1.2 Andere Transkriptionsfaktoren	6
1.1.3 PI3K/AKT	7
1.1.4 FOXO Transkriptionsfaktoren	9
1.1.4.1 Regulation über AKT	10
1.1.4.2 Regulation über die JNK	11
1.1.4.3 Weitere Regulationsmechanismen	12
1.1.4.4 FOXO regulierte Zielgene	13
1.1.4.5 Bedeutung von FOXO in Krebszellen	14
1.2 Apoptose	15
1.2.1 Caspasen	16
1.2.2 Bcl-2 Proteinfamilie	18
1.3 Oxidativer Stress	18
1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies	19
1.3.2 Antioxidative Enzyme	20
1.3.2.1 Superoxiddismutasen	20
1.3.2.2 Katalase	20
1.3.3 Oxidativer Stress: Bedeutung für die Zellen	21
1.4 Pro-oxidative Stimuli	23
1.4.1 TNF- α	23
1.4.2 Doxorubicin	26
1.5 Fragestellung	29
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Abkürzungen	32
2.2 MATERIAL	33
2.2.1 Bakterienstämme & Zelllinien	33
2.2.2 Plasmide	33
2.2.3 Medien & Antibiotika	34
2.2.4 Lösungen & Puffer	35
2.2.5 Molekulargewichtsstandards	37
2.2.6 Synthetische Primer	37
2.2.7 Antikörper	38

2.2.8	Enzyme & Substrate	39
2.2.9	Transfektionsreagenzien.....	39
2.2.10	Chemikalien	39
2.2.11	Geräte	41
2.2.12	Sonstige Materialien	41
2.2.13	Computerhardware und -software.....	42
2.3	METHODEN	42
2.3.1	Zellkultur	42
2.3.2	Inkubation/Schädigung der Zellen.....	43
2.3.3	Einfrieren & Auftauen von Zellen	43
2.3.4	Mikroskopie von Zellen	43
2.3.4.1	Lichtmikroskopie	43
2.3.4.2	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.3.5	Zytotoxizität	43
2.3.5.1	MTT-Test	43
2.3.5.2	Neutralrot-Test.....	44
2.3.5.3	Multi-Tox Fluor Assay	44
2.3.6	Zell-Zyklus Analyse.....	44
2.3.7	Wachstumskurve	44
2.3.8	Immunzytochemie.....	44
2.3.9	Transiente Transfektion	45
2.3.10	Reporter Assays	46
2.3.10.1	Luciferase Assay (Promega/Biothema)	46
2.3.10.2	SEAP Assay (Clontech/Tropix)	47
2.3.11	Apoptosenachweis.....	47
2.3.11.1	Caspase Assay	47
2.3.11.2	APO-ONE Assay.....	47
2.3.11.3	DNA-Fragmentationsanalyse	47
2.3.12	Nachweis von ROS (H ₂ DCF-DA)	48
2.3.13	Nukleinsäuren.....	49
2.3.13.1	RNA Isolation mit Trizol.....	49
2.3.13.2	Konzentrationsbestimmung von DNA & RNA	49
2.3.13.3	„Reverse Transcription PCR“ (RT-PCR).....	49
2.3.13.4	„ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “ (PCR).....	49
2.3.13.5	Quantitative <i>Realtime</i> PCR	50
2.3.13.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA & RNA	51
2.3.13.7	Isolation von DNA aus Agarosegelen über Gelelution	51
2.3.13.8	Enzymatische Reaktionen an DNA	52
2.3.14	Bakterien	52
2.3.14.1	Ligation von DNA	52
2.3.14.2	Transformation.....	52
2.3.14.3	Isolation von Plasmid DNA.....	52
2.3.14.4	Glycerin Stocks.....	53

2.3.15 Proteine	53
2.3.15.1 Isolation von Proteinen.....	53
2.3.15.2 Proteinbestimmung	54
2.3.15.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	54
2.3.15.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot).....	55
2.3.15.5 Färbung filtergebundener Proteine.....	55
2.3.15.6 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine.....	55
2.3.15.7 Chemilumineszenz Detektion.....	55
2.3.15.8 Strippen von PVDF- Membranen	56
2.3.15.9 <i>In vitro</i> Transkription/Translation	56
2.3.15.10 Messung der Katalase Enzymaktivität.....	56
2.3.16 Statistische Auswertung.....	57
3. ERGEBNISSE.....	58
3.1 Modulation des endogenen Redox-Status	58
3.1.1 Katalase und TNF- α in MCF-7 Zellen	58
3.1.1.1 hmlsKatalase Klonierung	59
3.1.1.2 Charakterisierung der Katalase Expression	61
3.1.1.3 Einfluss der Katalase auf die TNF- α Wirkung.....	65
3.1.1.4 TNF- α abhängige Regulation antioxidativer Enzyme.....	67
3.1.1.5 TNF- α abhängige Regulation von NF- κ B	69
3.1.1.6 TNF- α abhängige Regulation weiterer Transkriptionsfaktoren.....	73
3.1.2 Katalase und FOXO3a.....	75
3.1.3 Katalase und Doxorubicin in Hct-116 Zellen	81
3.1.3.1 Charakterisierung der Katalase Expression	81
3.1.3.2 Einfluss der Katalase auf die Doxorubicin Wirkung	82
3.1.3.3 Doxorubicin abhängige Regulation antioxidativer Enzyme	83
3.2 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin	86
3.2.1 Zytotoxizität	86
3.2.2 Regulation von NF- κ B, AP-1, NFAT, c-Myc	87
3.2.3 Zelltod und Apoptose.....	93
3.2.4 Zellmorphologie	94
3.2.5 Zellzyklus.....	96
3.3 Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Wirkung.....	100
3.3.1 Doxorubicin vermittelte Apoptose	100
3.3.2 FOXO4 Überexpression, Apoptose und Zellzyklus	101
3.3.3 FOXO4 und JNK.....	104
3.3.4 FOXO4 und PI3K/AKT	107
4. DISKUSSION.....	117
4.1 Modulation des endogenen Redox-Status	117
4.1.1 Katalase und TNF- α in MCF-7 Zellen	118
4.1.2 Einfluss der Katalase auf die TNF- α Wirkung.....	120

4.1.3 Katalase und FOXO3a.....	128
4.1.4 Einfluss der Katalase auf die Doxorubicin Wirkung in Hct-116.....	134
Zellen	134
4.2 Ausblick I.....	137
4.3 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin	140
4.4 Ausblick II.....	147
4.5 Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Sensitivität.....	149
4.5.1 Doxorubicin vermittelte Apoptose und Akkumulation von ROS	150
4.5.2 FOXO4 Überexpression, Apoptose und Zellzyklus	151
4.5.3 Bedeutung des JNK-Signalweges für den Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Sensitivität	151
4.5.4 Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges für den Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Sensitivität	153
4.6 Ausblick III.....	162
5.1 ZUSAMMENFASSUNG	165
5.2 SUMMARY	167
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	169
7. ANHANG	189
Tabellen der Originaldaten	189
Veröffentlichungen.....	205
Danksagung	206
Eidesstattliche Erklärung	207

1. Einleitung

1.1 Zelluläre Signaltransduktion

Physiologische Antworten in den Zellen können durch die zelluläre Signaltransduktion nach exogenen Stimuli oder intrazellulären Veränderungen aktiviert werden. Dabei können sowohl Schutzprogramme initiiert als auch Signalwege für den programmierten Zelltod aktiviert werden. Im Folgenden werden einige Signalwege und Transkriptionsfaktoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, eingeführt.

1.1.1 NF- κ B

NF- κ B (nuclear factor κ light chain B) wurde ursprünglich als nukleärer Faktor in B-Zellen im Zusammenhang mit der Expression von leichten κ (kappa) Ketten von Immunglobulinen entdeckt (Gilmore und Temin, 1986). NF- κ B bezeichnet allgemein eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die strukturell ähnlich sind und an der Regulation von immunologischen und inflammatorischen Reaktionen, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und dem Zelltod beteiligt sind (Perkins *et al.*, 2006). Die NF- κ B Familie der Säuger kann in 2 größere Gruppen eingeteilt werden: zum einen die NF- κ B Proteine und zum anderen die Rel Proteine. Beide Gruppen besitzen N-terminal eine 300 Aminosäuren lange sogenannte *Rel homology* Domäne (RHD), die DNA-Bindung, Dimerisierung, nukleäre Lokalisation und Interaktion mit den I κ B Inhibitor Proteinen ermöglicht (Ghosh *et al.*, 1998; Huxford *et al.*, 1999; Li und Verma, 2002). Die Gruppe der Rel Proteine beinhaltet c-Rel, RelB und RelA (p65). Die Gruppe der NF- κ B Proteine setzt sich aus NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52) zusammen, wobei diese als Vorstufen mit einer Größe von 105 (p105) und 100 (p100) kDa synthetisiert werden. Durch proteolytische Spaltung des C-terminalen Stückes entstehen die p50 und p52 Untereinheiten (Beinke *et al.*, 2004). Durch Homo- oder Heterodimerisierung der NF- κ B und Rel Untereinheiten bilden sich die eigentlichen NF- κ B Transkriptionsfaktoren aus, wobei p50/RelA Heterodimere am häufigsten in Zellen vorkommen (Gilmore, 2006). Die Struktur der einzelnen Untereinheiten ist entscheidend für die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen. RelA und c-Rel besitzen beide eine Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus und können so die Transkription NF- κ B-abhängiger Gene aktivieren. RelB besitzt diese TAD ebenfalls und kann nach Dimerisierung mit p50 und p52 als NF- κ B

Transkriptionsfaktor fungieren. Dimere aus RelB/RelA dagegen wirken inhibitorisch, da sie nicht an die DNA binden können (Marienfeld *et al.*, 2003). p50 und p52 besitzen keine TAD und können daher nur die Transkription von Zielgenen induzieren, wenn sie mit einem der Rel Proteine Heterodimere bilden (Li und Verma, 2002).

Die inhibitorischen κB (I κB) Proteine sind von großer Bedeutung für die Regulation und Aktivität von NF- κB . Die Familie der I κB Proteine beinhaltet mehrere Proteine (u. a. I $\kappa\text{B}\alpha$, I $\kappa\text{B}\beta$, I $\kappa\text{B}\gamma$, I $\kappa\text{B}\epsilon$), die unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen NF- κB Dimeren besitzen und über Phosphorylierung und proteolytische Spaltung reguliert werden (Chen und Ghosh, 1999). In den meisten Säugerzellen sind daher die NF- κB Dimere gebunden an Mitglieder der I κB Protein Familie im Zytoplasma lokalisiert (Hayden und Ghosh, 2004). Die I κB Proteine dienen somit in erster Linie der Maskierung der *nuclear localisation sequence* (NLS), die in der RHD der NF- κB Proteine liegt, und halten so NF- κB im inaktiven Zustand.

1.1.1.1 NF- κB Signalwege

NF- κB kann durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden. Proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1), Bakterien, Lipopolysaccharide (LPS), Viren, virale Proteine und zellulärer Stress (UV, Strahlung, Chemotherapeutika) können NF- κB aktivieren (Lee *et al.*, 2007). Es existieren drei charakteristische NF- κB Aktivierungswege: Der Erste ist der kanonische oder klassische Signalweg, der vor allem durch proinflammatorische Zytokine (z. B. TNF- α) initiiert wird (Hoffmann *et al.*, 2006). Der alternative oder nicht-kanonische Signalweg dagegen wird durch z. B. Lymphotoxin oder CD40 Liganden vor allem in B-Zellen ausgelöst. Im Unterschied zum klassischen Signalweg spielt I κB hier keine Rolle bei der zytoplasmatischen Retention der NF- κB Untereinheiten. Vielmehr liegt ein Dimer aus NF- $\kappa\text{B}1$ (p100) oder 2 (p105) und einem Mitglied der Rel Protein Gruppe im Zytoplasma vor. So lange p100 oder p105 noch nicht proteolytisch in die funktionellen Untereinheiten p50 oder p52 gespalten sind, fungieren sie im Zytoplasma wie die I κB Proteine und verhindern einen nukleären Import von funktionellem NF- κB . Kommt es zur Initiierung dieses Signalweges, wird die proteolytische Spaltung über eine NF- κB -*inducing kinase* (NIK) abhängige Aktivierung von IKK α Homodimeren induziert und die funktionellen Heterodimere aus Rel und p50 oder p52 können in den Zellkern translozieren (Xiao *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2006). Als dritter Aktivierungsweg ist

der atypische NF- κ B Signalweg beschrieben, der durch DNA-Schäden und Stressstimuli ausgelöst wird (Lee *et al.*, 2007). Im Folgenden werden der klassische und der atypische NF- κ B Signalweg näher betrachtet. In Abbildung 1 sind beide vereinfacht nebeneinander dargestellt. Der klassische NF- κ B Signalweg resultiert in der Aktivierung des prototypischen NF- κ B Heterodimers p50/RelA. Die Aktivierung des sogenannten IKK Signalosoms, das sich aus den zwei Kinasen IKK α und IKK β und dem NF- κ B *essential modulator* (NEMO) zusammensetzt, führt zu einer IKK β

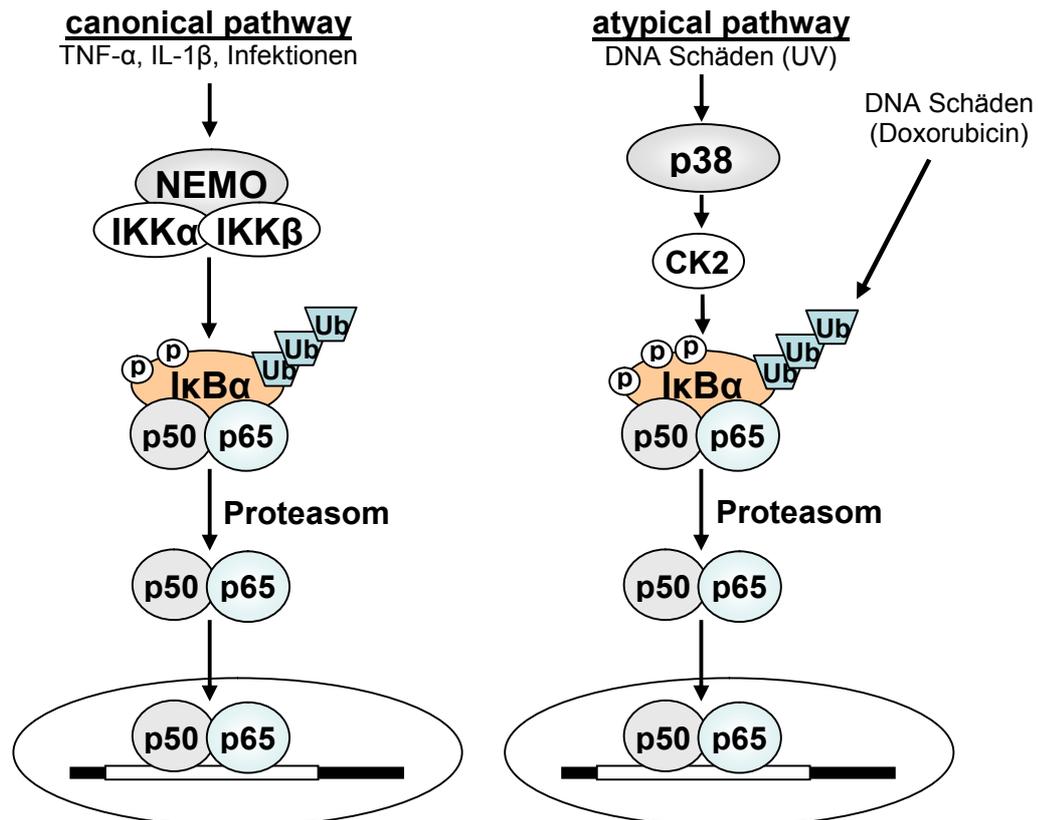


Abb.1: NF- κ B Signalwege (modifiziert nach Lee *et al.*, 2007).

abhängigen Phosphorylierung von I κ B α . Diese Phosphorylierung ist das Signal für eine anschließende Ubiquitinylierung von I κ B und seine proteolytische Degradation durch das Proteasom. Die NLS (*nuclear localisation sequence*) der NF- κ B Untereinheiten liegt nun exponiert vor und die NF- κ B Heterodimere akkumulieren im Zellkern und können dort über DNA Bindung die Transkription von Zielgenen aktivieren. Da dieser Signalweg von proinflammatorischen Zytokinen und pathogenen Stimuli ausgelöst wird, muss es sich um eine schnelle und starke Aktivierung handeln. In akuten Stress Situationen kann so eine schnelle Antwort in den Zellen induziert werden (Janssens und Tschopp, 2006). Der atypische NF- κ B Signalweg wird durch DNA Schäden und Chemotherapeutika ausgelöst. Im Gegensatz zum klassischen Weg handelt es sich hierbei um eine schwächere und

langsamere Aktivierung von NF- κ B. Die Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Degradation von I κ B erfolgt beim atypischen Signalweg unabhängig von den IKKs. Stattdessen führt die DNA Schädigung von Zellen mit UV-Licht zu einer Rekrutierung von p38. Über eine p38-abhängige Aktivierung der CK2 Kinase kommt es zu einer Phosphorylierung von I κ B α am C-Terminus und darauffolgend wird I κ B ubiquityliert und degradiert. Die p50/RelA Heterodimere können in den Zellkern translozieren und die Transkription NF- κ B-abhängiger Gene aktivieren (Kato *et al.*, 2003). Das Chemotherapeutikum Doxorubicin wiederum induziert die Degradation von I κ B über das Proteasom, ohne eine Phosphorylierung von I κ B zu erzeugen. Durch die direkte Degradation von I κ B können die NF- κ B Heterodimere im Zellkern akkumulieren und die Transkription von Zielgenen modulieren (Tergaonkar *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2004). Neben den bereits erwähnten Stimuli wird eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Aktivierung von NF- κ B diskutiert. Es zeigte sich jedoch, dass die Bildung von ROS nicht obligatorisch für die Aktivierung von NF- κ B ist. Vielmehr ist die ROS-vermittelte NF- κ B Aktivierung Stimulus und Zelltyp spezifisch (Schoonbroodt und Piette, 2000; Garg und Aggarwal, 2002; Hayakawa *et al.*, 2003). Das gleiche gilt für eine direkte Aktivierung von NF- κ B durch H₂O₂ Stimulation. Auch hier ist die Responsivität von NF- κ B abhängig vom Zelltyp (Takada *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2007).

1.1.1.2 NF- κ B regulierte Zielgene

Durch Bindung der NF- κ B Homo- und Heterodimere an die κ B Bindedomäne (GGGRNWYYCC, s. Abb.2) wird ein breites Spektrum von Zielgenen auf transkriptioneller Ebene reguliert. In Abbildung 2 ist eine Übersicht über einige durch NF- κ B modulierte Gene dargestellt. Die am besten untersuchte und bekannteste Funktion von NF- κ B ist die Zytprotektion durch die Induktion von antiapoptotischen und antioxidativen Molekülen. Die Regulation umfasst dabei die Expression von Proteinen, die an verschiedenen Stellen die apoptotischen Signalkaskaden (siehe 1.2) blockieren können. Die IAPs (IAPs – *inhibitor of apoptosis proteins*) zum Beispiel können die Aktivierung der Procaspase-9 verhindern (Deveraux *et al.*, 1998; Liston *et al.*, 2003; Wright und Duckett, 2005). Induzierte antiapoptotische Bcl-2

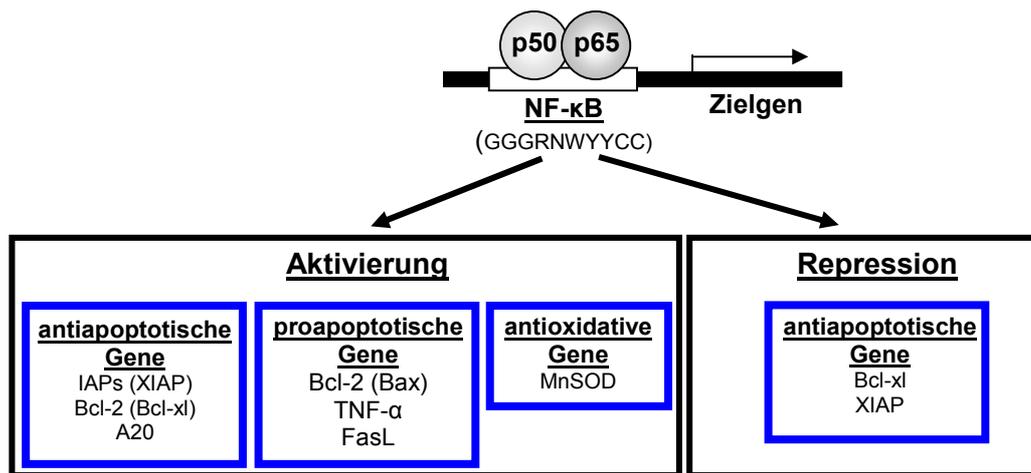


Abb.2: NF-κB regulierte Zielgene in der Übersicht (nach Dutta *et al.*, 2006). NF-κB Konsensus Sequenz: GGGRNWYYCC; R = Adenin oder Guanin; N = jedes Nukleotid; W = Adenin oder Thymin; Y = Cytosin oder Thymin.

Proteine andererseits können die Wirkung der proapoptotischen Bcl-2 Proteine antagonisieren (Grossmann *et al.*, 2000; Catz und Johnson, 2001). A20 und c-Flip wiederum sind an der Regulation der Weiterleitung von Rezeptor-vermittelten Signalen beteiligt. Eine transkriptionelle Induktion des A20 Zink-Finger Proteins blockiert sowohl die NF-κB Aktivierung als auch die TNF-α induzierte Apoptose (Beyaert *et al.*, 2000). Zusätzlich führt A20 zu einer Degradierung von RIP (*receptor interacting protein*, siehe 1.4.1) (Wertz *et al.*, 2004). Durch die Induktion der MnSOD Expression wird über NF-κB die Akkumulation von intrazellulären ROS verhindert (Bernard *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2002; Delhalle *et al.*, 2002). Charakteristisch sind diese schützenden Funktionen vor allem für den kanonischen NF-κB Signalweg nach Induktion durch TNF-α. Bei der TNF-α Inkubation werden proapoptotische Mechanismen (Caspasen) und antiapoptotische Mechanismen (NF-κB) aktiviert und über das Verhältnis der beiden Prozesse zueinander das Schicksal der Zelle bestimmt (Luo *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2006; Papa *et al.*, 2006). Im Abschnitt 1.4.1 werden die Charakteristika der TNF-α Signaltransduktion noch einmal eingehender betrachtet. Neben der antiapoptotischen Wirkung kann NF-κB auch eine proapoptotische Wirkung auf Zellen ausüben. Dies geschieht z. B. durch die Induktion von Todesliganden (TNF-α, FasL) oder die verstärkte Expression von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie (Bax) (Shakhov *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1999; Kasibhatla *et al.*, 1999; Grimm *et al.*, 2005). Atypische NF-κB Aktivatoren, wie Doxorubicin, Daunorubicin und UV-Strahlung können neben der bereits beschriebenen transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen auch eine NF-κB abhängige Repression auf

Transkriptionsebene hervorrufen. Nach UV-Strahlung oder Daunorubicin Stimulus rekrutiert RelA die Histon Deacetylase 1 (HDAC1). HDAC1 beeinflusst durch direkte und indirekte Interaktionen mit RelA dessen transkriptionelle Aktivität und DNA Bindung. RelA fungiert daraufhin als transkriptioneller Repressor von antiapoptotischen Genen (XIAP, Bcl-xl) (Campbell *et al.*, 2004). Doxorubicin hat einen ähnlichen Effekt auf RelA, allerdings fungiert RelA als transkriptioneller Repressor, ohne dass vorher HDAC1 rekrutiert wurde (Ho *et al.*, 2005). Die Stimulation von Zellen mit Doxorubicin kann über NF- κ B sowohl zu pro- als auch antiapoptotischen Wirkungen führen. Diese Eigenschaft von Doxorubicin wird in Abschnitt 1.4.2 noch einmal aufgegriffen.

1.1.2 Andere Transkriptionsfaktoren

Weitere charakteristische in den Zellen vorliegende Transkriptionsfaktoren sind AP-1 (*activator protein-1*) und das Proto-Onkogen c-Myc. Allerdings ist deren Wirkung abhängig vom exogenen Stimulus und anderen Signalwegen in den Zellen. Die Säuger AP-1 Proteine sind Homo- und Heterodimere, die sich aus *basic-region leucin zipper* (bZIP) Proteinen zusammensetzen. Diese gehören zu den Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra-2), JDP (*Jun dimerization partners*; JDP1, JDP2) und ATF (*activating transcription factors*; ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF) Unterfamilien (Hess *et al.*, 2004). Die AP-1 Faktoren kontrollieren die Transkription von Genen, die eine AP-1 Bindestelle (TGAG/CTCA) besitzen (Hess *et al.*, 2004). Dabei werden vor allem Gene für die Proliferation, die Differenzierung und Transformation (Cyclin D1/A/E, p53, p21) (Shaulian und Karin, 2001; 2002) und pro- und antiapoptotische Gene (FasL, Bim, IAPs) beeinflusst (Eichhorst *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2003). AP-1 Transkriptionsfaktoren können über ihre basale Aktivität hinaus auch durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden (Lee *et al.*, 1987). Dazu gehören TNF- α (Garg und Aggarwal, 2002), IL-1 (Lee *et al.*, 2006), H₂O₂ (Kikuta *et al.*, 2006), Wachstumsfaktoren (Monje *et al.*, 2003) oder Doxorubicin (Shinoda *et al.*, 2005).

Das Proto-Onkogen c-Myc hat in den Zellen als Transkriptionsfaktor divergente Funktionen. Ursprünglich wurde für c-Myc eine Beteiligung an der Regulation der Proliferation und vor allem an der malignen Transformation nachgewiesen (Bouchard *et al.*, 1998). Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass c-Myc auch an der Regulation der Apoptose beteiligt ist und eine proapoptotische Funktion

besitzt (Meyer *et al.*, 2006). Eine Fehlregulation von c-Myc kann andere Signalwege, wie PI3K/AKT, inhibieren (Bellmann *et al.*, 2006). Der Verlust der c-Myc Aktivität kann andererseits auch einen schützenden Einfluss gegen exogene Stimuli, z. B. Doxorubicin, haben (Grassilli *et al.*, 2004). Zusätzlich ist die Aktivität von c-Myc abhängig von NF- κ B: Als Transkriptionsfaktor reguliert NF- κ B die Expression von c-Myc und damit die c-Myc vermittelte Proliferation (La Rosa *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2005).

1.1.3 PI3K/AKT

Die Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3Ks) gehören zu einer Familie konservierter Lipid Kinasen, die 3'-Hydroxylgruppen von Phosphoinositiden phosphorylieren. Das

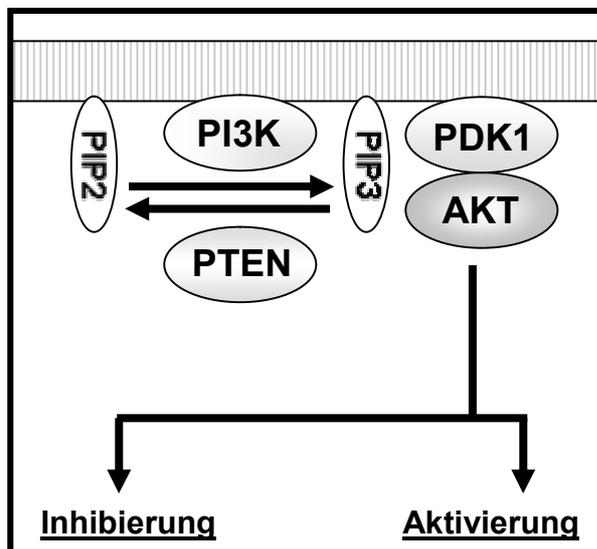


Abb.3: PI3K/AKT Signalweg (modifiziert nach Yuan und Cantley, 2008).

bekannteste Produkt dieser Reaktionen ist das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), das als *second messenger* die Kinase AKT rekrutiert und zur ihrer Aktivierung beiträgt (Cantley, 2002). Der onkogene PI3K/AKT Signalweg reguliert die Proliferation und das Überleben von Zellen. In vielen Tumorzellen ist dieser Signalweg konstitutiv aktiviert, sodass diese gegen exogene Stimuli geschützt sind und weiter proliferieren können

(Testa und Bellacosa, 2001). Abbildung 3 zeigt die Regulation des PI3K/AKT Signalweges. Nach einem aktivierenden Stimulus (z. B. Insulin) wird die PI3-Kinase (PI3K) an die Plasmamembran rekrutiert. PI3K phosphoryliert PIP₂ zum Lipid *second messenger* PIP₃. PIP₃ wiederum rekrutiert PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) und AKT durch Bindung an ihre PH (*pleckstrin homology*) Domäne (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000). Die PDK1 kann daraufhin die AKT Kinase durch Phosphorylierung (Threonin 308, Serin 473) aktivieren. Der PI3K/AKT Signalweg wird durch seinen Antagonisten PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) reguliert. Die Phosphatase PTEN wandelt die Phosphatidylinositol-Lipide (PIP₃) wieder in ihre inaktivierte Form (PIP₂) um, sodass die AKT nicht aktiviert werden kann (Blanco-Aparicio *et al.*, 2007). Der PI3K/AKT Signalweg kann neben dem Insulin Stimulus auch durch ROS aktiviert und reguliert werden. Moderate ROS Mengen in

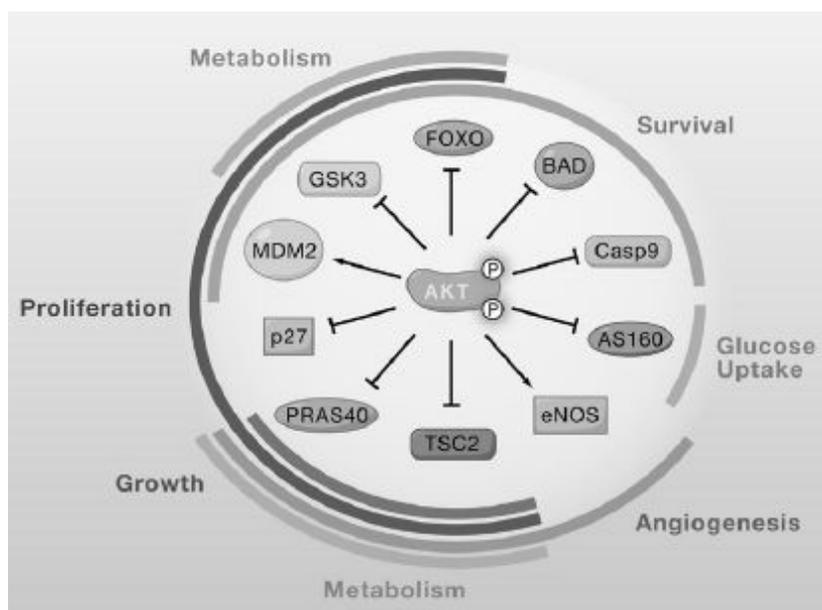


Abb.4: AKT Zielmoleküle aus Manning und Cantley, 2007. AKT abhängige Zielmoleküle. Die Phosphorylierung resultiert entweder in einer Aktivierung oder Hemmung der Moleküle und die angegebenen zellulären Prozesse (Proliferation, Überleben, Wachstum) werden beeinflusst.

Phosphorylierung der Phosphatase PTEN inhibiert sie und führt zur Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges (Lee *et al.*, 1998; Yu und Whorton, 2005). Zusätzlich ist die direkte Oxidierung der Kinasen AKT und PI3K möglich. Diese Oxidierung führt in der Regel zu einer Inaktivierung des PI3K/AKT Signalweges (Murata *et al.*, 2003).

Kommt es durch exogene Stimuli oder ROS zu einer Aktivierung der AKT, phosphoryliert diese zahlreiche Zielmoleküle, unter anderem Transkriptionsfaktoren, an speziellen Serin und Threonin Resten. Diese Phosphorylierungen führen entweder zu einer Aktivierung oder einer Inaktivierung. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von AKT-Substraten identifiziert worden, welche für unterschiedliche Prozesse in der Zelle verantwortlich sind. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über die durch die AKT Kinase regulierten Prozesse, Moleküle und Transkriptionsfaktoren. Durch Phosphorylierung der gezeigten Substrate wirkt die AKT Kinase in erster Linie aktivierend auf die Proliferation und inhibierend auf die Apoptose (Manning und Cantley, 2007). Daher wird der PI3K/AKT Signalweg auch häufig als Überlebensweg bezeichnet. Eine wichtige Gruppe AKT regulierter Transkriptionsfaktoren sind die Mitglieder der FOXO-Familie. Diese sind, wie in Abbildung 4 zu erkennen, an der Regulation des Überlebens, des Metabolismus und der Proliferation der Zellen beteiligt und werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

den Zellen führen zu einer Aktivierung des Signalweges und zu einem Überleben der Zellen. Die Akkumulation großer ROS Mengen dagegen inhibiert den PI3K/AKT Signalweg und der Zelltod wird eingeleitet (Leslie, 2006). Verschiedene Moleküle des PI3K/AKT Signalweges sind redoxsensitiv. Direkte Phos-

1.1.4 FOXO Transkriptionsfaktoren

Bei den Forkhead Transkriptionsfaktoren handelt es sich um eine Protein Superfamilie in der alle Proteine die so genannte konservierte FKH DNA-Bindedomäne (*forkhead box* „FOX“) besitzen. Diese Bindedomäne besteht aus 100 Aminosäuren und bildet 3 α -Helices, 2 β -Stränge und 2 großen Flügel ähnlichen (*wing-like*) Schleifen aus. Daher werden diese Moleküle auch als „*winged-helix*“ Transkriptionsfaktoren bezeichnet (Kaestner *et al.*, 2000; Boura *et al.*, 2007). Über die Bindung der DNA Bindedomäne an die Konsensussequenz TT(G/A)TTTAC kann

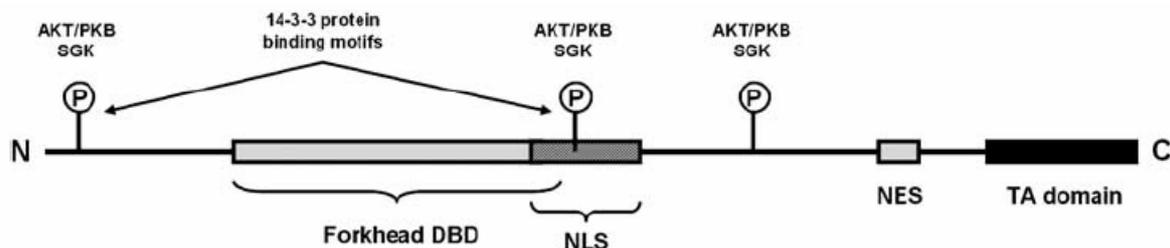


Abb.5: FOXO Phosphorylierungsstellen. DBD – DNA binding domain; NLS – nuclear localisation sequence; NES – nuclear export sequence; TA – transactivation domain (modifiziert nach: Obsil und Obsilova, 2008)

die Transkription von Zielgenen durch die FOXO Faktoren reguliert werden (Tsai *et al.*, 2007). Die FOXO Transkriptionsfaktoren sind ortholog zum DAF-16 Transkriptionsfaktor von *Caenorhabditis elegans*, der die Stress Resistenz und die Lebensspanne reguliert (Van der Horst und Burgering, 2007). Bei den Säugern umfasst die Klasse O die Transkriptionsfaktoren FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHRL1), FOXO4 (AFX) und FOXO6.

Die FOXO Faktoren wurden ursprünglich an Chromosomen Translokationen in humanen Tumoren identifiziert. Die Verknüpfung zwischen den FOXO Faktoren und Tumoren führte dazu, dass diese Transkriptionsfaktoren als mögliche Ziele in der Tumorthherapie untersucht werden (Galili *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Parry *et al.*, 1994; Borkhardt *et al.*, 1997; Hillion *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998; Xia und Barr, 2005). Die FOXO Faktoren besitzen 3 Akt-abhängige Phosphorylierungsstellen, die charakteristische FKH DNA Bindedomäne, die NLS (*nuclear localisation sequence*) und NES (*nuclear export sequence*) für den Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma und eine Transaktivierungsdomäne (TA) (Obsil und Obsilova, 2008). Während FOXO1, FOXO3a und FOXO4 an der Regulation von Proliferation, Zellzyklus, Apoptose und Metabolismus beteiligt sind (Calnan und Brunet, 2008) und die in Abbildung 5 gezeigten Strukturmerkmale besitzen, ist die Rolle von FOXO6 noch nicht eindeutig geklärt

(Huang und Tindall, 2007; Obsil und Obsilova, 2008). FOXO6 fehlt die C-terminale AKT-Phosphorylierungsstelle und daher ein Bindemotiv für die 14-3-3 Proteine (siehe 1.1.4.1). Ein Austransport aus dem Kern ist daher nicht möglich. FOXO6 ist zwar konstitutiv im Zellkern lokalisiert, kann jedoch durch die AKT-Phosphorylierung an den anderen beiden Stellen (Threonin 26, Serin 184) zumindest inaktiviert werden (van der Heide *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2007). Eine Grundvoraussetzung für die regulatorische Funktion der FOXOs auf transkriptioneller Ebene ist die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Im Folgenden werden die Regulation und die Zielmoleküle der drei FOXO Transkriptionsfaktoren FOXO1, FOXO3a und FOXO4 betrachtet.

1.1.4.1 Regulation über AKT

Der PI3K/AKT Signalweg reguliert die Lokalisation der FOXO Faktoren durch inhibierende Phosphorylierung. FOXO1, FOXO3a und FOXO4 besitzen jeweils 3 AKT-abhängige Phosphorylierungsstellen (FOXO1: Threonin 24, Serin 256, Serin 319; FOXO3a: Threonin 32, Serin 253, Serin 315; FOXO4: Threonin 28, Serin 193, Serin 258) (Arden, 2006). Abbildung 6 zeigt schematisch die Regulation der FOXOs über den PI3K/AKT Signalweg. Wird der PI3K/AKT Signalweg z. B. durch Wachstumsfaktoren (Insulin) aktiviert, kommt es zu einer Phosphorylierung der FOXOs an den genannten Stellen. Die Phosphorylierung resultiert in der Bindung

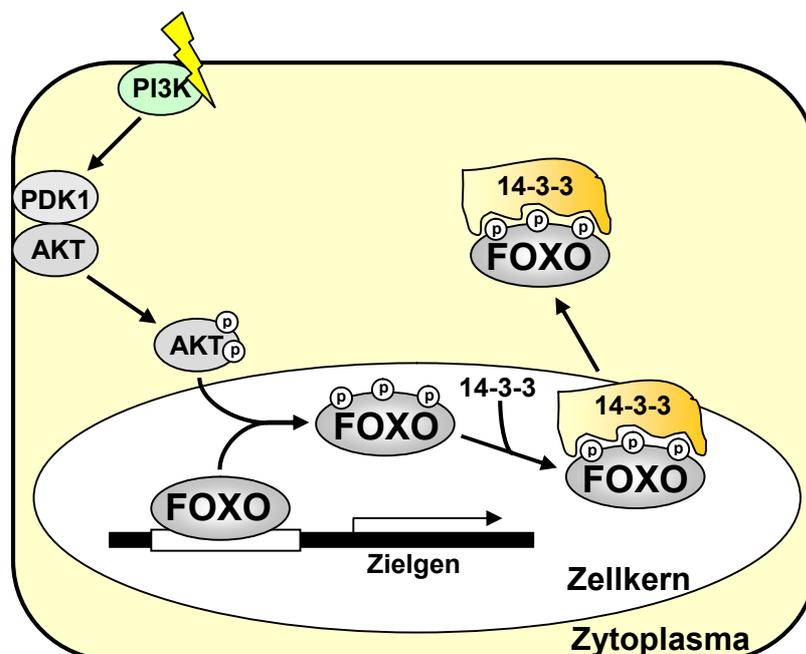


Abb.6: PI3K/AKT-abhängige Regulation der FOXO Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach Weidinger *et al.*, 2008).

von 14-3-3 Proteinen. Diese verhindern zum einen die DNA Bindung, zum anderen erfolgt durch die Bindung der 14-3-3 Proteine eine Konformationsänderung der FOXOs. Die Kern-exportsequenz (NES) wird exponiert und Proteine der Exportmaschinerie können dort binden und den Transport ins Zyto-

plasma initiieren (Brunet *et al.*, 2002). Zusätzlich wird vermutet, dass die Bindung der 14-3-3 Proteine zu einer Maskierung der Kernimportsequenz (NLS) führt und so der Rücktransport in den Zellkern verhindert wird. Die FOXO Transkriptionsfaktoren liegen nach dem Austransport aus dem Zellkern inaktiv im Zytoplasma vor und können dort durch das Proteasom degradiert werden (Obsilova *et al.*, 2005; Hermeking und Benzinger, 2006).

1.1.4.2 Regulation über die JNK

Als Folge von oxidativem Stress kann eine Phosphorylierung der FOXO Transkriptionsfaktoren auch über die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) erfolgen. Im Gegensatz zu den PI3K/AKT abhängigen Phosphorylierungsstellen führt eine Phosphorylierung durch die JNK zur Aktivierung von FOXO. Die JNK-abhängige Phosphorylierung ist bis jetzt eindeutig für FOXO4 beschrieben (Essers *et al.*, 2004). Abbildung 7 zeigt schematisch die durch H_2O_2 induzierte Aktivierung von FOXO4. Die Induktion von oxidativem Stress in den Zellen führt zu einer Phosphorylierung von FOXO4 an den Stellen Threonin 447 und Threonin 451. Diese

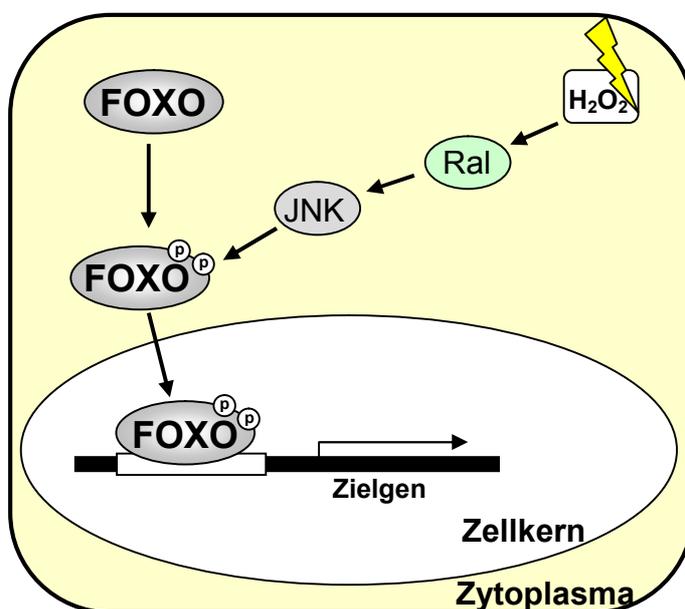


Abb.7: JNK-abhängige Regulation der FOXO Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach Weidinger *et al.*, 2008).

Phosphorylierungsstellen sind bei den anderen Mitgliedern der FOXO Familie nicht konserviert. Die Phosphorylierung führt zur Translokation von FOXO4 in den Zellkern und schlussendlich zur transkriptionellen Aktivierung der antioxidativen Enzyme MnSOD und Katalase. Diese Induktion erhöht den Schutz der Zellen gegen oxidativen Stress, sodass in Form eines negativen Feedback die ROS, die die FOXO4 Aktivierung erst

ermöglicht haben, abgefangen werden (Essers *et al.*, 2004). Auch FOXO3a kann über die Menge an intrazellulärem H_2O_2 reguliert werden. Nemoto und Finkel (2002) postulieren das Redox Protein p66shc als Regulator für die Aktivierung von FOXO3a. Das MUC1 Onkoprotein kann ebenfalls die Aktivität von FOXO3a regulieren. Bei

oxidativem Stress kann MUC1 den PI3K/AKT Signalweg dämpfen, sodass FOXO3a nicht der AKT-abhängigen inhibitorischen Phosphorylierung unterliegt und aktiv im Kern verbleibt (Yin *et al.*, 2004).

Somit haben Wachstumsfaktoren wie Insulin und oxidativer Stress entgegengesetzte Wirkungen auf die FOXO Lokalisation und damit den Aktivitätsstatus von FOXO in den Zellen. Interessanterweise konnte bei gleichzeitiger Einwirkung von Insulin und H₂O₂ gezeigt werden, dass der Effekt des Wachstumsfaktors durch den oxidativen Stress ausgelöscht wurde und FOXO im Zellkern lokalisiert war (Frescas *et al.*, 2005). Unter Umständen regulieren sich die beiden verschiedenen Signalwege gegenseitig. Für die JNK wird angenommen, dass sie die 14-3-3 Proteine phosphoryliert. Daraufhin setzen diese ihre Bindungspartner frei und im Falle von FOXO können diese wieder in den Zellkern translozieren (Tsuruta *et al.*, 2004; Sunayama *et al.*, 2005).

1.1.4.3 Weitere Regulationsmechanismen

Neben der Phosphorylierung können die FOXO Transkriptionsfaktoren durch weitere Modifikationen reguliert werden. Die transkriptionelle Aktivität der FOXO Faktoren wird im Kern zusätzlich durch Acetylierung und Deacetylierung kontrolliert. Die nukleär lokalisierten FOXOs können an Faktoren (z. B. p300, *CREB-binding protein* (CBP)) binden, die den Acetylierungsstatus der FOXOs regulieren können (Daitoku *et al.*, 2004, van der Horst *et al.*, 2004; Frescas *et al.*, 2005; Perrot und Rechler, 2005; Arden, 2006). Nach Stimulation mit H₂O₂ zum Beispiel bindet acetyliertes FOXO3a im Kern an Sirtuine (SIRT) und wird daraufhin deacetyliert. Sirtuine sind Deacetylasen, die NAD⁺ als Ko-Faktor benutzen (Imai *et al.*, 2000). Die Deacetylierung von FOXO3a führt zur verstärkten Expression von antioxidativen Zielgenen. Im Gegensatz dazu ist die Expression von proapoptotischen Zielgenen gehemmt (Brunet *et al.*, 2004). Es wird zusätzlich diskutiert, dass der Acetylierungsstatus der FOXOs die Phosphorylierung durch die AKT regulieren kann. Die Deacetylierung von FOXO1 durch SIRTs sensibilisierte FOXO1 für die AKT Phosphorylierung (Matsuzaki *et al.*, 2005b). Einzelheiten zu dieser Form der Regulation müssen jedoch noch besser charakterisiert werden.

Neben der Acetylierung können die FOXO Faktoren ubiquitinyliert werden. Polyubiquitinylierung durch SKP2 führt dabei zum Abbau von FOXO1

(Huang *et al.*, 2005). Die Monoubiquitylierung von unphosphoryliertem zytoplasmatischem FOXO dagegen führt zur Aktivierung und zum nukleären Import. Die Mechanismen sind allerdings noch nicht eindeutig aufgeklärt (van der Horst *et al.*, 2006; Arden, 2006). Für FOXO4 konnte allerdings bereits USP7/HAUSP als deubiquitylierendes Enzym nachgewiesen werden. Die Modifikation über USP7/HAUSP führte nach einem Stress Stimulus zur Hemmung der transkriptionellen Aktivität (van der Horst *et al.*, 2006).

1.1.4.4 FOXO regulierte Zielgene

Über die Bindung der FOXO Transkriptionsfaktoren an die FOXO Bindestelle TT(G/A)TTTAC (DBE – *daf binding element* oder IRS – *insulin responsive element*) kann eine Vielzahl von Zielgenen induziert oder reprimiert werden. In Abbildung 8 ist eine Übersicht über die Prozesse und Zielgene dargestellt, die durch FOXO Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Die FOXO Faktoren regulieren die Expression von Proteinen, die am Fortschreiten des Zellzyklus beteiligt sind. Sind die FOXOs aktiviert, kann es zu einem Zellzyklusarrest kommen. Die Expression der Cycline D und G wird z. B. reprimiert, wohingegen die Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p27^{kip} und p21^{waf} induziert werden (Medema *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Ramaswamy *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2002). Die antioxidativen Enzyme Katalase, MnSOD und Peroxiredoxin III und das an der

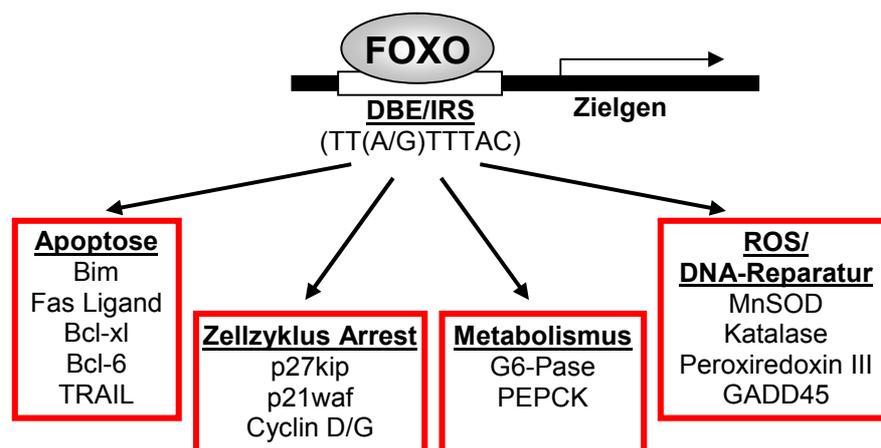


Abb.8: Zielgene der FOXO Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach Weidinger *et al.*, 2008).

Reparatur von DNA Schäden beteiligte GADD45 werden ebenfalls durch FOXO induziert. Demnach können FOXOs einen Schutz gegen zellulären Stress vermitteln (Tran *et al.*, 2002; Furukawa-Hibi *et al.*, 2002; Kops *et al.*, 2002; Nemoto und Finkel, 2002; Essers *et al.*, 2004; Chiribau *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2008).

Nach der Überexpression von im Zellkern lokalisierten, konstitutiv aktiven Formen von FOXO konnte in den Zellen zusätzlich eine Induktion von proapoptotischen Proteinen und die Einleitung des programmierten Zelltods beobachtet werden. Fas Ligand (FasL), TRAIL, Bim (BH3 *only* Protein, siehe 1.2.4) und Bcl-6, das wiederum das antiapoptotische Bcl-xl reprimierte, werden induziert (Brunet *et al.*, 1999; Modur *et al.*, 2002; Dijkers *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002). Schlussendlich sind die FOXO Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Proteine des Glukosemetabolismus beteiligt. Die Expression der an der Gluconeogenese beteiligten Glucose 6-Phosphatase (G6Pase) und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) werden durch FOXOs induziert (Schmoll *et al.*, 2001; Nakae *et al.*, 2001; Yeagley *et al.*, 2001).

1.1.4.5 Bedeutung von FOXO in Krebszellen

Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften kommt den FOXO Transkriptionsfaktoren in den Zellen eine Bedeutung als Regulatoren bei der Entstehung von Krebs zu (Arden, 2006; Reagan-Shaw und Ahmad, 2007). Aus den bisherigen Erkenntnissen geht hervor, dass sie als Schaltstelle für den Zellzyklus Arrest, den Zelltod und den Schutz gegen Stress Stimuli fungieren. Zusätzlich werden die FOXO Transkriptionsfaktoren über zelluläre Signalwege beeinflusst, die in Tumorzellen häufig fehlreguliert sind. Beispielhaft soll hier der PI3K/AKT Signalweg angeführt werden. Der PI3K/AKT Überlebens-Signalweg ist in den meisten Tumorzellen durch Mutation seines Antagonisten PTEN konstitutiv aktiviert (Vivanco und Sawyers, 2002; Brader und Eccles, 2004). Diese Aktivierung kann mit einer Inaktivierung von FOXO und somit einem Verlust der FOXO Funktionen in Verbindung gebracht werden (Jackson *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Modur *et al.*, 2002). 60 - 80 % der humanen Prostata Tumoren z. B. tragen eine Mutation im PTEN Gen. Diese führt zu einer verminderten PTEN Expression und Aktivierung und daraus folgend zu einer Inaktivierung von FOXO über den PI3K/AKT Signalweg. Die Überexpression von FOXO in Prostata Krebszellen dagegen führt zum programmierten Zelltod durch Induktion von TRAIL (Modur *et al.*, 2002). Aus diesen bereits bekannten Eigenschaften von FOXO folgt, dass die FOXO Proteine einen neuen Angriffspunkt in der Krebstherapie bieten könnten.

1.2 Apoptose

Zellen können im Wesentlichen über zwei Wege untergehen: über den programmierten Zelltod, die Apoptose, oder über den „ungeordneten“ Zelltod, die Nekrose. Die Nekrose ist ein pathologischer, passiver Prozess. Nach einer Schädigung kommt es zu einem Anschwellen der Zellen. Die Zellmembran verliert ihre Integrität, wird lysiert und Zelltrümmer und Enzyme werden in den Extrazellularraum freigesetzt. Infolgedessen kommt es zu entzündlichen Reaktionen und Schädigungen des umliegenden Gewebes (Abb.9) (Van Cruchten, 2002; de Bruin und Medema, 2008).

Die Apoptose dagegen bezeichnet den physiologischen oder programmierten Zelltod. Sie wurde erstmalig 1972 von Kerr *et al.* beschrieben. Im Gegensatz zur Nekrose, dem pathologischen Zelltod, handelt es sich bei der Apoptose um einen regulierten, aktiven Prozess in den Zellen. Bei der Apoptose schrumpfen die Zellen. Das Chromatin kondensiert und die DNA wird von spezifischen Endonukleasen zwischen den Nukleosomen geschnitten. Es entstehen charakteristische Fragmente mit einem Vielfachen von 180 Basenpaaren, die in einem Agarosegel als DNA-Leiter nachgewiesen werden können. Die Zellen bilden daraufhin Membran umschlossene apoptotische Körperchen, die die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten.

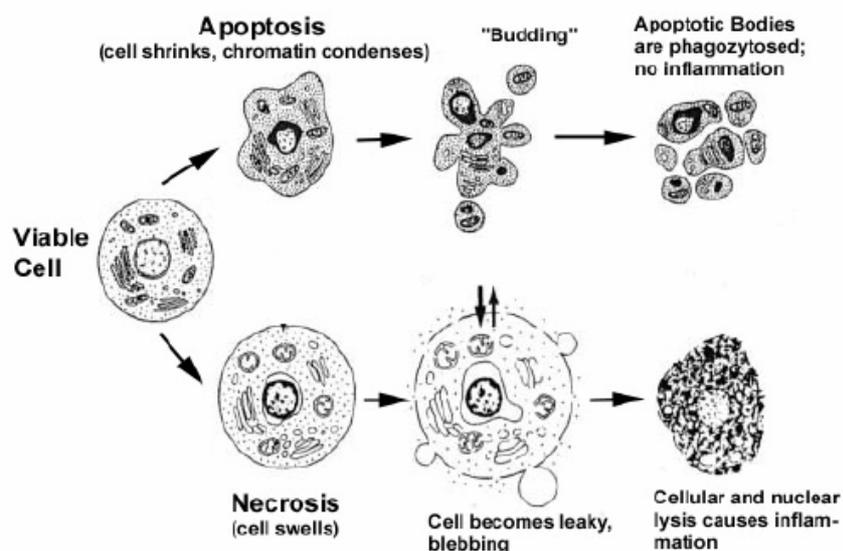


Abb.9: Morphologische Veränderungen bei Apoptose und Nekrose. Die Apoptose beinhaltet das Schrumpfen der Zelle, eine Kondensation des Chromatins und die Bildung von apoptotischen Körperchen, die Organellen, Zytosol und nukleäre Fragmente enthalten. Diese werden von Makrophagen phagozytiert ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen. Bei der Nekrose dagegen schwellen die Zellen an, sie platzen, es kommt zur Freisetzung der zellulären Bestandteile in das umliegende Gewebe und zu einer Entzündungsreaktion (modifiziert nach Van Cruchten, 2002).

Während der Apoptose verliert die Membran ihre Asymmetrie, sodass das Phosphatidylserin an die Zelloberfläche gelangt. Diese Umlagerung des Phosphatidylserins dient als Trigger für umliegende Zellen und Makrophagen, die apoptotischen Körperchen zu phagozytieren (Abb.9) (Van Cruchten, 2002; de Bruin und Medema, 2008). Bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle, da nicht mehr benötigte Zellen gezielt ausgeschaltet werden können. In der Entwicklung und im lebenden Organismus wird zum Beispiel über die Apoptose die Anzahl der Zellen reguliert. Eine Fehlregulation der Apoptose trägt jedoch auch zur Entstehung von neurodegenerativen und kardiovaskulären Krankheiten und Krebs bei (Zimmermann *et al.*, 2001).

1.2.1 Caspasen

Wichtige Mediatoren für die Apoptose in den Zellen sind die Caspasen. Bei den Caspasen handelt es sich um eine Familie von Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein tragen und ihre Substrate C-terminal von Aspartatresten spalten. Zu den Substraten der Caspasen gehören Strukturproteine, Enzyme und Procaspasen (Degterev *et al.*, 2003). Die Proteinfamilie der Caspasen umfasst (bei Säugern) 14 Proteasen. Sie werden als Procaspasen synthetisiert und liegen im Zytoplasma inaktiv vor. Strukturell bestehen die Caspasen aus einer Prodomäne, an die sich eine lange (ca. 20 kDa) und eine kurze (ca. 10 kDa) Untereinheit anschließt. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch Abspaltung der beiden Untereinheiten und der Prodomäne. Die beiden Untereinheiten lagern sich nach der Spaltung neu zusammen und die Homodimerisierung zweier solcher Komplexe führt zur aktiven Caspase (Degterev *et al.*, 2003). Aufgrund ihrer Funktionen in der Apoptose können die Caspasen in 2 Gruppen eingeteilt werden. (1) Initiatorcaspasen (Caspase-8/-10; Caspase-9): Die Initiatorcaspasen besitzen lange Prodomänen mit charakteristischen Protein-Protein Interaktionsstellen, die die Selbstassoziation der Caspasen, die Bindung an Adaptermolekülen (z. B. FADD, Apaf) und die Autoaktivierung der Caspasen bewirken. Die Aktivierung der Caspase-9 z. B. findet in einem Komplex mit Apaf-1 statt. Die Initiatorcaspasen bewirken durch die Aktivierung von Effektorcaspasen die Weiterleitung des proapoptischen Signals in den Zellen (Degterev *et al.*, 2003; Jin und El-Deiry, 2005). (2) Effektorcaspasen (Caspase-3/-7): Die Effektorcaspasen besitzen im Gegensatz zu den Initiatorcaspasen nur eine kurze Prodomäne. Sie

werden durch die Initiatorcaspasen aktiviert und können entweder weitere Caspasen aktivieren oder sind an zellulären Effekten im Verlauf der Apoptose beteiligt. Die Effektorcaspasen spalten Strukturproteine, induzieren die spezifische Degradation der DNA, inaktivieren DNA-Reparaturenzyme und sind an der Exposition des Phosphatidylserins an der Zelloberfläche beteiligt (Fadok *et al.*, 2001; Henson *et al.*, 2001). Die Aktivierung der Caspasen bei der Apoptose kann über den extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Signalweg, oder den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg aktiviert werden.

Die extrinsisch vermittelte Apoptose geht von der Zellmembran aus und wird durch Bindung eines Todesliganden (z. B. FasL, TNF- α , TRAIL) an seinen Rezeptor initiiert (Ashkenazi und Dixit, 1998). Es kommt zur Rekrutierung von Adapter Proteinen (z. B. FADD; *Fas associated death domain protein*), die wiederum Pro-Caspase-8/-10 rekrutieren und so den DISC Komplex (*death inducing signaling complex*) bilden (Kischkel *et al.*, 1995). In diesem Komplex werden die Caspasen-8/-10 aktiviert. Die aktivierten Caspasen-8/-10 können direkt die Effektorcaspase-3/-7 aktivieren oder über das Molekül Bid eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren und so eine zusätzlich Aktivierung der Initiatorcaspase-9 erreichen (Rust *et al.*, 2000). Die induzierten Kaskaden führen zur Aktivierung weiterer Procaspasen und daraus folgend zum apoptotischen Tod der Zellen (Movassagh und Foo, 2008).

Die intrinsische Apoptose geht von den Mitochondrien aus. Die Aktivierung kann einerseits durch exogene Stimuli, wie Zytostatika, Fehlen von Wachstumsfaktoren oder UV-Strahlung ausgelöst werden. Andererseits können auch intrazelluläre Signale wie die Bildung von ROS und DNA Schäden die mitochondrial vermittelte Apoptose auslösen (Foo *et al.*, 2005). Es kommt zu einer Störung des mitochondrialen Membranpotenzials und zu einer Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma. Dort bildet Cytochrom c zusammen mit Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) einen Komplex. Durch die Bindung an Cytochrom c verändert sich die Konformation von Apaf-1 und die Bindestelle für die Procaspase-9 wird exponiert. Nach Bindung von (d)ATP wird die Procaspase-9 über die Bindestelle ihrer Prodomäne rekrutiert und es entsteht das Apoptosom. In diesem kommt es zur Aktivierung der Procaspase-9. Der letzte Schritt ist die Rekrutierung und Aktivierung anderer Procaspasen (Effektorcaspasen) durch das Apoptosom und die

Weiterleitung des apoptotischen Signals (Rodriguez und Lazebnik, 1999; Jin und El-Deiry, 2005; Movassagh und Foo, 2008).

1.2.2 Bcl-2 Proteinfamilie

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie spielen eine wichtige Rolle beim Ablauf der mitochondrial vermittelten Apoptose. Jedes Protein besitzt mindestens eine sogenannte Bcl-2 *homology domain* (BH). Aufgrund ihrer Struktur und Funktion können die Bcl-2 Proteine in drei Gruppen eingeteilt werden. (1) Antiapoptotische Proteine: z. B. Bcl-2 und Bcl-xl, die 4 BH Domänen besitzen (BH1 – BH4). (2) Proapoptotische Proteine: z. B. Bax und Bak mit 3 BH Domänen (BH1 – BH3). (3) BH3-only Proteine: z. B. Bim, Bid, Puma. Die Bcl-2 Proteine der Gruppe (3) Stellen die Verbindung zwischen der extrinsisch und intrinsisch vermittelten Apoptose her. Sie sorgen für die Weiterleitung des extrinsischen Apoptosesignals zu den Mitochondrien und so zu einer Verstärkung der Apoptosekaskaden (Debatin, 2004; Adams und Cory, 2007; Kroemer *et al.*, 2007). Kommt es zu einem Apoptose Stimulus oligomerisieren die Bcl-2 Proteine der Gruppe (2) (z. B. Bax) nach einer Konformationsänderung miteinander und translozieren vom Zytoplasma an die Mitochondrien Membran. Nach Oligomerisierung bilden sie eine Poren-ähnliche Struktur aus und unterstützen die Freisetzung von Cytochrom c (Kuwana *et al.*, 2002; Pagliari *et al.*, 2005). Die BH3-only Proteine der Gruppe (3) (z. B. Bim, Bid) können die Translokation von Bax und Bak entweder direkt aktivieren oder die antiapoptotische Wirkung von z. B. Bcl-xl der Gruppe (1) verhindern (Letai *et al.*, 2002; Willis und Adams, 2005). Die antiapoptotischen Proteine der Gruppe (1) sind in den Mitochondrien lokalisiert und schützen diese gegen die Permeabilisierung der Membran durch die anderen Bcl-2 Proteine. Zusätzlich sind die antiapoptotischen Mitglieder in anderen Zellkompartimenten vertreten und verhindern so die Translokation der anderen Bcl-2 Proteine an die Mitochondrien (Levine *et al.*, 2008).

1.3 Oxidativer Stress

Extrazelluläre Stimuli vermitteln ihre Effekte auf die zelluläre Signaltransduktion häufig durch die zusätzliche Induktion von oxidativem Stress in den Zellen. Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies wiederum können weitere Mechanismen und Signale in den Zellen aktivieren und hemmen, oder als Ko-Aktivatoren fungieren.

Im Folgenden ist ein Überblick über die reaktiven Sauerstoffspezies, antioxidative Schutzmechanismen und die Bedeutung des oxidativen Stresses für die Zellen zusammengestellt.

1.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen im Organismus als Nebenprodukte des aeroben Metabolismus. Der Hauptbildungsort von endogenen ROS in den Zellen ist dabei die mitochondriale Atmungskette (Le Bras *et al.*, 2005). Auch exogene Stimuli (UV-Strahlung, chemische Verbindungen) können die Bildung von ROS in den Zellen induzieren (Pillai *et al.*, 2005; Goetz und Luch, 2008). Zu den ROS gehören Superoxidradikalanionen ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH^{\cdot}). Organische Hydroperoxide (ROOH) und Peroxylradikale (ROO^{\cdot}) sind andere freie Radikale oder ihre Äquivalente. Während sowohl Superoxidradikalanionen als auch Hydroxylradikale sehr reaktiv sind, handelt es sich bei H_2O_2 um ein stabileres Zwischenprodukt. Allerdings generiert H_2O_2 in Gegenwart von redoxaktiven Schwermetallen das sehr reaktive Hydroxylradikal in der sogenannten Fenton-Reaktion (1). Die in der Fenton-Reaktion oxidierten Schwermetalle werden in einer Folgereaktion mit dem Superoxidradikalanion zurück in ihren Ausgangszustand reduziert (2). Fenton-Reaktion und die Reduktion der Schwermetalle ergeben zusammen die Haber-Weiss-Reaktion (3):

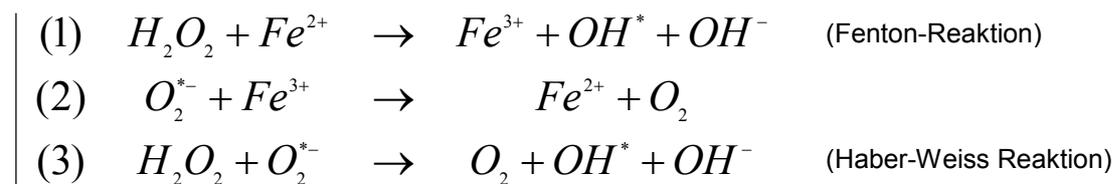


Abb.10: Fenton- und Haber-Weiss Reaktion (nach Valko *et al.*, 2007).

Die radikalischen Sauerstoffspezies, vor allem das Hydroxylradikal, können einen direkten Effekt auf Makromoleküle ausüben und Zellschäden verursachen. Zielmoleküle in den Zellen sind die Zellmembran, Proteine und DNA (Trachootham *et al.*, 2008). Die Auswirkungen von oxidativem Stress in den Zellen wird in Abschnitt 1.3.3 aufgegriffen und erläutert.

1.3.2 Antioxidative Enzyme

Unter physiologischen Bedingungen können die Zellen die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies mit Hilfe von Antioxidanzien ausgleichen, sodass in den Zellen ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen herrscht (Klaunig und Karmendulis, 2004). Die Zellen besitzen sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische antioxidative Schutzsysteme gegen ROS. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidanzien gehören unter anderem die fettlöslichen Vitamine E (α -Tocopherol) und A (Retinoide) sowie das wasserlösliche Vitamin C (Ascorbinsäure) und Thiol Antioxidanzien (Glutathion, Thioredoxin) (Valko *et al.*, 2006). Auch andere im Plasma vorhandene chemische Verbindungen wie Bilirubin, Harnsäure, Steroide und Ubichinone stellen wichtige nicht-enzymatische Antioxidanzien dar (Neuzil und Stocker, 1993). Nachfolgend werden das effizientere enzymatische antioxidative System aus Superoxiddismutasen, Katalase und Glutathionperoxidasen beschrieben.

1.3.2.1 Superoxiddismutasen

Eine wichtige Gruppe von antioxidativen Enzymen, die die Disproportionierung des Superoxidanionradikals zu H_2O_2 und Sauerstoff katalysiert (4), sind die Superoxiddismutasen (SOD).

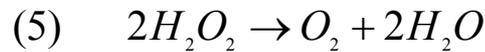


In verschiedenen Zellkompartimenten liegen unterschiedliche Formen der Superoxiddismutasen vor. Die Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD) ist im Zytoplasma lokalisiert (Faraci und Didion, 2004). Hierbei handelt es sich um ein homodimeres Enzym, das aus zwei Untereinheiten mit jeweils Kupfer und Zink Ionen im aktiven Zentrum besteht (Valko *et al.*, 2006). Die MnSOD ist ein homotetrameres Enzym, das ein Mangan Atom pro Untereinheit beinhaltet (Valko *et al.*, 2006) und in den Mitochondrien exprimiert wird (Faraci und Didion, 2004).

1.3.2.2 Katalase

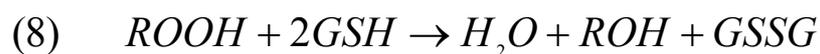
Das von den Superoxiddismutasen generierte H_2O_2 kann entweder über die Katalase oder die Glutathionperoxidasen abgebaut werden. Die Katalase ist ein ubiquitäres Enzym, dessen höchste Aktivität in der Leber, dem Hauptentgiftungsorgan, vorliegt, gefolgt von der Niere und den Erythrozyten. Die geringste Aktivität findet sich in den Kardiomyozyten (Marklund *et al.*, 1982, Sato *et al.*, 1992). Das antioxidative Enzym

Katalase schützt die Zellen gegen toxische Effekte von H_2O_2 , indem es die Disproportionierung von H_2O_2 zu Sauerstoff und Wasser, ohne Bildung von neuen reaktiven Sauerstoffspezies, katalysiert (5). Bei dieser Reaktion besitzt das Enzym sehr hohe Umsatzraten mit ca. 6 Millionen H_2O_2 Molekülen pro Minute (Valko *et al.*, 2006).



Bei niedrigen H_2O_2 Konzentrationen ($< 1 \mu M$) kann die Katalase als Peroxidase fungieren und eine Vielzahl von Substanzen (z. B. Methanol, Ethanol, Formaldehyd) oxidieren (6) (Scandalios, 2005). Bei der Katalase handelt es sich um ein tetrameres Enzym mit einer Größe von 60-65 kDa. Die 4 identischen Untereinheiten der Katalase besitzen jeweils eine Eisen-Häm-Gruppe (Kirkman und Gaetani, 1984). Zusätzlich zum Eisen in der prosthetischen Gruppe ist an jede Untereinheit ein NADPH Molekül gebunden, um die Katalase gegen einen direkten Angriff und eine Inaktivierung durch H_2O_2 zu schützen (Kirkman und Gaetani, 1984).

Neben der Katalase kann H_2O_2 in den Zellen von den Glutathionperoxidasen abgebaut werden (7). Die Glutathionperoxidasen sind tetramere Proteine mit vier Selen-Atomen, gebunden als Selenocystein im aktiven Zentrum. Sie werden in den Zellen hauptsächlich zum Abbau von Peroxiden benötigt.



Für die katalytische Aktivität benötigen die Enzyme reduziertes Glutathion (GSH) als Coenzym für die Reduktion von H_2O_2 (7) oder von Peroxiden (ROOH) (8). Die gebildeten oxidierten Glutathion Dimere (GSSG) können nachfolgend durch die Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert werden (Fourquet *et al.*, 2008).

1.3.3 Oxidativer Stress: Bedeutung für die Zellen

Die intrazelluläre Redox-Homöostase, d. h. die Balance zwischen Reduktions- und Oxidationsprozessen, ist von fundamentaler Bedeutung für das Überleben und die Funktion der Zelle. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden von allen aeroben Organismen gebildet und abgebaut. Die Modulation des Gleichgewichtes zwischen diesen beiden Reaktionen führt entweder zur Bildung von niedrigen, physiologischen

Konzentrationen an ROS, die für die normale Zellfunktion benötigt werden, oder aber zur Bildung von hohen, pathophysiologischen ROS Mengen, die einen oxidativen Stress zur Folge haben (Lau *et al.*, 2008). Unter physiologischen oxidativen Bedingungen interagieren ROS mit zellulären Signalmolekülen in einer reversiblen Form und beeinflussen dadurch unter anderem als *second messenger* die Regulation von zellulären Funktionen. Oxidativer Stress dagegen führt zu irreversiblen Veränderungen von zellulären Makromolekülen (Trachootham *et al.*, 2008). Die Lipidperoxidation ist eine Kettenreaktion, die durch oxidative Veränderungen von Lipiden ausgelöst wird. Neben der Schädigung der Membranstruktur entstehen an ihrem Ende Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE), die wiederum mit DNA und Proteinen reagieren können (Girotti, 1998; Pinchuk *et al.*, 1998; Valko *et al.*, 2006). An der DNA entstehen DNA Addukte, wie 8-OHdG (8-Hydroxyguanin), die die fehlerfreie Transkription und die Replikation der DNA behindern. ROS können jedoch auch DNA Strangbrüche durch direkten Angriff auf das Zucker-Phosphatrückgrat induzieren (Breen und Murphy, 1995; Haghdoost *et al.*, 2005). Proteine können durch ROS oxidiert werden. Es entstehen modifizierte und degradierte Aminosäuren, die neue funktionelle Gruppen wie Hydroxyl- und Carbonylgruppen erhalten. Als Folgeereaktionen können Proteinfragmentierung, Quervernetzung und Zerstörung der Tertiärstruktur und damit der Verlust der Funktionalität auftreten (Poppek und Grune, 2006; Valko *et al.*, 2006). Diese direkten Veränderungen von Makromolekülen können einen Eingriff in die zelluläre Signaltransduktion und eine Induktion der Apoptose oder cytotoxischer Effekte nach sich ziehen (Trachootham *et al.*, 2008). Der Eingriff in die Signaltransduktion kann dabei in der Regel durch direkte oder indirekte Regulationsmechanismen erfolgen. Über die bereits erwähnten direkten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und deren Funktions- und Strukturverlust kann eine Signalkaskade beeinflusst werden (Kamata und Hirata., 1999; Heneberg und Draber, 2005). Die Carbonylierung z. B. führt zu einer Deaktivierung von Bcl-2 (England und Cotter, 2005). Andererseits kann die transkriptionelle Expression von Signalmolekülen beeinflusst sein. Zum Beispiel wird die DNA Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Oxidation ihrer Thiolgruppen inhibiert, sodass keine Expression von Zielgenen mehr initiiert werden kann (Turpaev, 2002). Schlussendlich zeigten Reinheckel *et al.* (2000), dass oxidativer Stress zur Hemmung des 26S Proteasoms

fürte und dadurch phosphorylierte und ubiquitinylierte Proteine nicht mehr degradiert werden konnten. Die Halbwertszeit dieser Proteine kann dadurch verlängert und so ein Signalweg konstitutiv aktiviert oder inhibiert werden (Poppek und Grune, 2006). Ein Übergewicht an ROS in den Zellen kann durch diese Eingriffe in die zelluläre Regulation auch zur Entstehung von Krankheiten beitragen. Dazu zählen die Tumorigenese, degenerative Erkrankungen und allgemeine Alterungsprozesse (Bertram und Hass, 2008).

1.4 Pro-oxidative Stimuli

Mit Hilfe von pro-oxidativen Substanzen ist es möglich, die intrazelluläre Redox-Homöostase in Richtung des oxidativen Stresses zu verschieben und die Veränderungen in der Signaltransduktion zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden das proinflammatorische Zytokin TNF- α und das Anthrazyklinderivat Doxorubicin als pro-oxidativ wirkende Modellnoxen verwendet.

1.4.1 TNF- α

Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) ist ein pleiotropes Zytokin, das ursprünglich aufgrund seiner Eigenschaft, Nekrose in Tumoren auszulösen, entdeckt und daher auch nach dieser Eigenschaft benannt wurde (Carswell *et al.*, 1975). TNF- α gehört, zusammen mit Lymphotoxin- α (LT α), Fas Ligand (FasL) CD40 Ligand (CD40L) und TNF-*related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) zu den Liganden der TNF- α Superfamilie (Ashkenazi und Dixit, 1998). TNF- α ist ein 157 Aminosäuren langes, 26 kDa großes Molekül, das Trimere aus drei identischen Untereinheiten bildet (Jones *et al.*, 1989). TNF- α besitzt eine breite Funktionsvielfalt, die weit über die Tumornekrose hinausgeht. Je nach Zelltyp und vorliegenden physiologischen Bedingungen kann TNF- α zu unterschiedlichen, zum Teil gegensätzlichen Konsequenzen führen. TNF- α kann ebenso Zelldifferenzierung und Proliferation wie Apoptose auslösen (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Die Induktion der Apoptose kann vor allem bei Tumorzellen *in vitro* beobachtet werden, allerdings existieren auch Tumorzelllinien, die gegenüber TNF- α unempfindlich reagieren (Bertazza und Mocellin; Mocellin und Nitti, 2008). Eine zentrale Rolle kommt TNF- α durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit bei proinflammatorischen Immunantworten zu (Aggarwal, 2003). Des Weiteren ist TNF- α auch bei allergischen Reaktionen, Asthma, Autoimmunerkrankungen und

Organabstoßungen beteiligt (Aggarwal, 2003). Bei der Abwehr von Pathogenen ist TNF- α vielfältig involviert, z. B. durch Apoptose-induktion in vireninfizierten Zellen (Tortorella *et al.*, 2000).

Seine vielfältigen Wirkungen vermittelt TNF- α über zwei membranständige Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2), die der TNF-Rezeptor Superfamilie zugeordnet werden (Ware, 2008). Während der TNF-R1 bis auf wenige Ausnahmen, wie z. B. in Erythrozyten, auf der Oberfläche aller Zellen konstitutiv exprimiert wird, findet man den TNF-R2 hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, wo seine Expression streng reguliert wird (Aggarwal, 2003). Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich zusätzlich in ihrer Affinität für TNF- α . Der TNF-R1 kann sowohl die membranständige als auch die lösliche Form des TNF- α , die eine Größe von 51 kDa hat und durch Prozessierung des membranständigen TNF- α durch die Metalloprotease TACE (TNF- α *converting enzyme*; Black *et al.*, 1997) entsteht, binden. Der TNF-R2 dagegen kann nur durch membranständiges TNF- α vollständig aktiviert werden (Grell *et al.*, 1995). Ein weiterer Unterschied ist, dass der TNF-R1 im Gegensatz zum TNF-R2 eine Todesdomäne (DD) besitzt (Wajant *et al.*, 2003). Beiden Rezeptoren gemeinsam ist, dass sie über keinerlei katalytische Aktivität verfügen und nach Aktivierung durch TNF- α Adapterproteine rekrutieren, welche die jeweilige Signalkaskade in Gang setzen. Die Signaltransduktion des TNF-R1 ist bereits relativ gut untersucht. Im Gegensatz dazu ist über die Funktion des TNF-R2 vergleichsweise wenig bekannt. In manchen Zellen, z. B. T-Zellen, scheint die Stimulation von TNF-R2 proliferativ zu wirken, in anderen Fällen unterstützt möglicherweise der TNF-R2 synergistisch die apoptotische Signalkaskade des TNF-R1, wobei es über den Mechanismus dieses Prozesses unterschiedliche Auffassungen gibt (MacEwan, 2002). Im Folgenden wird die durch den TNF-R1 vermittelte Signaltransduktion näher beschrieben. Nach Bindung von TNF- α an den TNF-R1 kommt es zur Rekrutierung von TRADD (*TNF receptor associated death domain*) an die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors (Abb.11). Für die Auslösung der Apoptose Kaskaden erfolgt als Nächstes die Bindung von FADD (*Fas associated death domain*) an TRADD. Diese beiden Proteine zusammen bilden einen Teil des DISC Komplexes (*death inducing signaling complex*). Als drittes Molekül werden die Procaspasen-8/-10 in den DISC Komplex rekrutiert und durch Oligomerisierung autoproteolytisch gespalten und aktiviert (Micheau und Tschopp, 2003; Shakibei *et al.*, 2005). Abhängig vom Zelltyp werden entweder direkt die

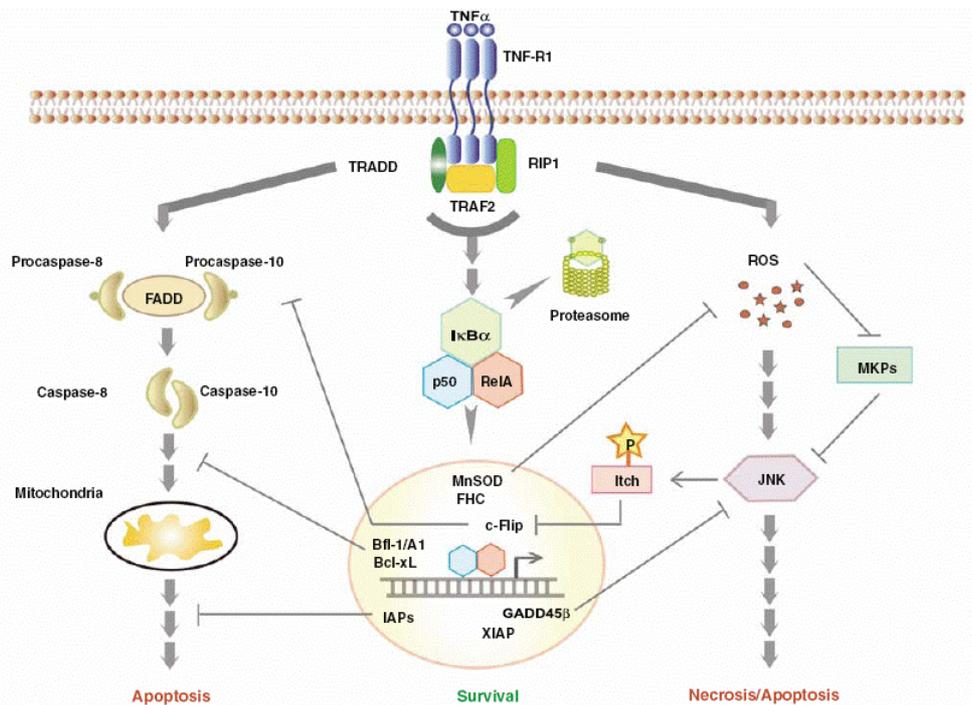


Abb.11: TNF-R1 Signalweg (Dutta *et al.*, 2006).

Capasen-3/-7 aktiviert (Typ-I) oder es erfolgt zusätzlich über das BH3 only Protein Bid die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges über die Mitochondrien und Caspase-9 (Typ-II) (Wajant *et al.*, 2003; Dutta *et al.*, 2006). Ein zweiter Signalweg, der zum Zelltod führt, verläuft über die Aktivierung der JNK (c-Jun terminale Kinase). Für die Aktivierung der JNK ist eine Rekrutierung von TRADD an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors nicht notwendig. Die Interaktion zwischen dem Rezeptor und RIP1 (*receptor interacting protein 1*) und eine zusätzliche Bildung von ROS in den Zellen führen zu einer Aktivierung der JNK (Jaattela und Tschopp, 2003; Papa *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006). Das Vorliegen von oxidativem Stress kann dabei die JNK Aktivierung aufrechterhalten, indem MAP-Kinase Phosphatasen (MKPs) durch ROS inaktiviert werden (Kamata *et al.*, 2005). Wie die Entscheidung darüber, ob in den Zellen die Apoptose über den DISC Komplex oder über RIP1 und ROS Akkumulation abläuft, gefällt wird, ist noch nicht eindeutig geklärt. Allerdings scheint der metabolische Status der Zellen von Bedeutung zu sein (Papa *et al.*, 2006). Stark proliferierende Zellen, die von der Glykolyse abhängig sind, sind empfänglicher für die JNK-abhängige Induktion der Nekrose. Ruhende Zellen dagegen sind abhängig von oxidativer Phosphorylierung und reagieren mit einer Induktion der Apoptose (Edinger und Thompson, 2004).

Erfolgt nach der Rekrutierung von TRADD anstelle der FADD Bindung eine Interaktion mit RIP1 und TRAF2 (*TNF-receptor associated factor 2*), kommt es zur Einleitung des klassischen NF- κ B Signalweges durch Aktivierung des Signalosom (IKK α , IKK β und NEMO). Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung und anschließenden Degradierung von I κ B α durch das Proteasom. NF- κ B transloziert in den Zellkern und aktiviert NF- κ B abhängige Gene (Micheau und Tschopp, 2003; Shakibei *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2006). Typische über diesen Signalweg aktivierte antiapoptotische Gene sind c-FLIP (*caspase-8 homologue FLICE inhibitory protein*) das mit Caspase-8/-10 um die Bindung im DISC Komplex konkurriert und somit die Einleitung der Apoptose Kaskade verhindert, oder die IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) und Bcl-xl, die an unterschiedlichen Stellen in die Apoptose Kaskade eingreifen können. Die Induktion der GADD45 Expression führt zur Hemmung der JNK-aktivierenden Kinase und somit zu einer Inhibierung des JNK vermittelten Zelltods (Papa *et al.*, 2004a,b). Auch antioxidative Gene wie die MnSOD werden zum Schutz der Zellen gegen oxidativen Stress aktiviert (Ranjan und Boss, 2006). Die Wirkung von TNF- α auf die Zellen umfasst sowohl den antiapoptotisch wirkenden NF- κ B Signalweg als auch proapoptotische Caspase Kaskaden. Das Schicksal der Zellen ist abhängig vom Verhältnis der induzierten Signalwege untereinander. Ist die Induktion des NF- κ B Signalweges stärker, sind die Zellen durch Expression antiapoptotischer Zielgene gegen die TNF- α vermittelte Apoptose besser geschützt (Zheng *et al.*, 2006). Neben der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der Apoptose und des NF- κ B Signalweges induziert TNF- α die Bildung von ROS in den Zellen. Hauptentstehungsort der ROS sind die Mitochondrien (Garg und Aggarwall, 2002). Die Rolle der ROS bei der Wirkung von TNF- α auf die Zellen wird kontrovers diskutiert. Sowohl die proapoptotische Aktivierung der Caspasen oder der JNK als auch die antiapoptotische Initiierung des NF- κ B Signalweges wird über die Akkumulation von ROS in den Zellen gesteuert (Garg und Aggarwall, 2002).

1.4.2 Doxorubicin

Das Anthrazyklinderivat Doxorubicin wird in der Tumorthherapie als Zytostatikum für die Behandlung einer Vielzahl von Krebsarten eingesetzt (Singal und Iliskovic, 1998). Doxorubicin vermittelt seine Wirkung durch direkten Einfluss auf die DNA in Form von DNA Interkalation, Quervernetzung von DNA Strängen und durch Hemmung der Topoisomerase II (Gerwitz, 1999). Zusätzlich reduzieren die mikrosomale

P450-Reduktase und NADPH Doxorubicin über eine Einelektronreduktion zu Semichinon Radikalen. Diese können Radikal-Reaktionen auslösen und ROS produzieren (Abb.12) (Navarro *et al.*, 2006).

Die gebildeten ROS können wiederum pro- und antiapoptotische Signalwege regulieren. Typische Beispiele für Doxorubicin regulierte Signalwege sind der NF- κ B und der PI3K/AKT Signalweg. Die Wirkung von Doxorubicin auf die Zellen führt zur atypischen Aktivierung des NF- κ B Signalweges (Tergaonkar *et al.*, 2003). Der Ausgang dieser atypischen Aktivierung nach DNA Schäden wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Effekte sind bereits beschrieben worden.

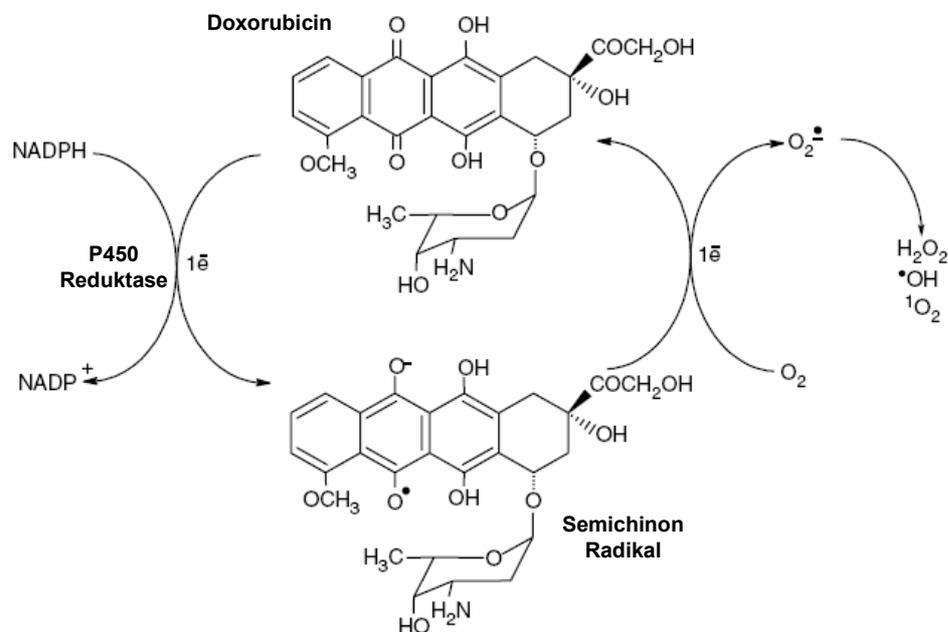


Abb.12: Doxorubicin als Redox-Zyklus. (modifiziert nach Kostrzewa-Nowak *et al.*, 2005)

So führte die Induktion von DNA Schäden zu einem antiapoptotischen Effekt nach NF- κ B Aktivierung in embryonalen Fibroblasten von Mäusen und humanen embryonalen Nierenzellen (Panta *et al.*, 2004; Tergaonkar *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006). In embryonalen Maus Fibroblasten, humanen embryonalen Nierenzellen und Mammakarzinom Zellen wurde nach Induktion eines DNA Schadens die RelA Untereinheit im Zellkern inhibiert, sodass keine Induktion antiapoptotischer Gene möglich war (Campbell *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005). Neben der Wirkung auf NF- κ B hat Doxorubicin auch einen stimulierenden Effekt auf den PI3K/AKT Signalweg. Die Aktivierung konnte in unterschiedlichen humanen Zelllinien nachgewiesen werden. Eine Hemmung dieses Signalweges führte zu einer Sensibilisierung von Karzinomzellen des Magen-Darm Traktes (Yu *et al.*, 2008), von

Mamma-Karzinomzellen (Li *et al.*, 2007a) und Hepatomzellen (Alexia *et al.*, 2006) gegen den Doxorubicin Stimulus. Zusätzlich ist die Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors durch Doxorubicin beschrieben. NFAT (*nuclear factor of activated T-lymphocytes*) ist ein Kalzium/Calcineurin abhängiger Transkriptionsfaktor, der nach Translokation in den Zellkern u. a. die Transkription des Todesliganden FasL induzieren kann (Latinis *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1998). Nach einer Inkubation mit Doxorubicin konnte in Ratten Kardiomyozyten eben diese NFAT-abhängige Aktivierung von FasL und damit die über den CD95 Rezeptor induzierte Apoptose nachgewiesen werden (Kalivendi *et al.*, 2005). Neben der Aktivierung redox-sensitiver Signalwege ist die Induktion der Apoptose nach Gabe von

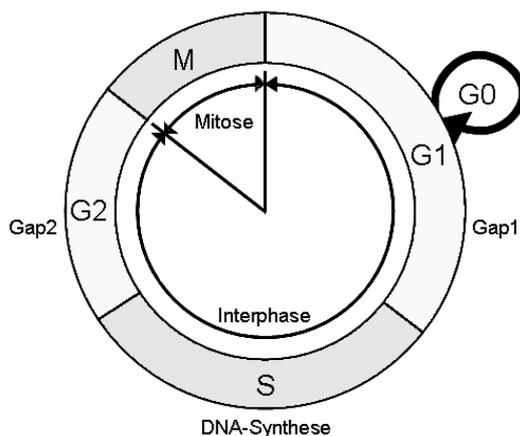


Abb.13: Zellzyklus Phasen.

Doxorubicin ebenfalls dokumentiert (Wang *et al.*, 2004; Bernuzzi *et al.*, 2008). Die Schädigung der DNA, aber auch die Akkumulation von ROS kann ferner zu einem Doxorubicin vermittelten Zellzyklus Arrest führen. Der Zellzyklus ist in 2 Phasen unterteilt. Die Interphase und die Mitosephase (M-Phase) (Abb.13). Die Interphase wiederum ist in drei Abschnitte gegliedert, G1, S, G2, und umfasst das generelle Zellwachstum, die DNA Synthese und alle weiteren Schritte zur Vorbereitung auf die Zellteilung. In der M-Phase finden die eigentliche Mitose und die Zytokinese statt (Gillett und Barnes 1998). Bei reparablen DNA Schäden ist der Zellzyklus Arrest transient und ermöglicht so die Behebung von Schäden und ein koordiniertes Fortschreiten des Zellzyklus. Sind die induzierten DNA-Schäden dagegen schwerwiegender, geht die Zelle in einen permanenten Arrest (Robles *et al.*, 1998; Siu *et al.*, 1999). Ein Regulator des Zellzyklus ist das Tumorsuppressorgen p53, das auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird. p53 induziert nach seiner Aktivierung die Transkription verschiedener Zielgene, die zu einem Zellzyklusarrest führen. Die Regulation und Aktivierung von p53 erfolgt in der Regel posttranskriptionell über eine Stabilisierung des Proteins (Jimenez *et al.*, 1999). Eine Phosphorylierung von p53 an der Stelle Serin392 zum Beispiel führt zu einer Tetramerisierung und Stabilisierung der p53 Proteine und damit zu einer besseren DNA-Bindungs Kapazität und transkriptionellen Aktivität

(Sakaguchi *et al.*, 1997). Ein charakteristisches Zielmolekül von p53 ist p21. Kommt es zu einer Aktivierung von p21, ist ein Zellzyklusarrest am G1/S Übergang (Stewart und Pietsenpol, 2001; Pietsenpol und Stewart, 2002), in der S-Phase (Waga *et al.*, 1994; Pietsenpol und Stewart, 2002), und am G2/M Übergang möglich (Bunz *et al.*, 1998; Pietsenpol und Stewart, 2002). Allerdings kann ein Zellzyklusarrest auch unabhängig von p53 und p21 ausgelöst werden. Die Mechanismen sind jedoch noch nicht eindeutig aufgeklärt (Kastan *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 2001; Lupi *et al.*, 2007).

1.5 Fragestellung

Für die Aufrechterhaltung von Regulationsprozessen in Zellen ist eine physiologische intrazelluläre Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von zentraler Bedeutung. Insbesondere H_2O_2 dient aufgrund seiner Membranpermeabilität als wichtiger *second messenger* für die Regulation von Signaltransduktionswegen und redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren. Das intrazelluläre Niveau an ROS wird unter anderem über antioxidative Enzyme reguliert. Die Katalase, eines der zellulären antioxidativen Enzyme, spielt dabei als ein Regulator der intrazellulären H_2O_2 Menge eine wichtige Rolle.

Um den intrazellulären Redox-Status der Zellen zu verändern und die Auswirkung auf redox-sensitive Signalwege zu untersuchen wurden in der vorliegend Arbeit zwei pro-oxidativ wirkende Modellnoxen (TNF- α und Doxorubicin) verwendet. Das pleiotrope Zytokin Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) vermittelt in den Zellen eine Vielzahl von biologischen Wirkungen. Diese umfassen neben der TNF- α vermittelten Zytotoxizität und Apoptose auch die Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B. Ein charakteristischer Effekt von TNF- α ist dabei die Akkumulation von ROS in den Zellen, die sowohl die Zytotoxizität als auch die Aktivierung des antiapoptotischen NF- κ B Signalweges vermitteln kann. Der erste Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit der Rolle von H_2O_2 bei der TNF- α vermittelten Zytotoxizität. Dazu wurde in MCF-7 Mamma-Karzinomzellen das antioxidative Enzym Katalase überexprimiert und somit das intrazelluläre Niveau an H_2O_2 reduziert. Mithilfe dieses Modellsystems sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1) Hat die Überexpression der Katalase und der damit veränderte H_2O_2 Status einen Einfluss auf die TNF- α vermittelte Zytotoxizität und Apoptose?

- 2) Ist die TNF- α vermittelte Regulation des redox-sensitiven NF- κ B Signalweges abhängig von der intrazellulären H₂O₂ Konzentration?
- 3) Hat der veränderte H₂O₂ Status zusätzlich Einfluss auf die Regulation anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und c-Myc?

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Transkriptionsfaktoren der „forkhead“ Superfamilie der Klasse O (FOXO). Der Transkriptionsfaktor FOXO3a, ein Mitglied dieser Superfamilie, ist ein Beispiel für einen weiteren durch H₂O₂ regulierten Transkriptionsfaktor. Zusätzlich ist FOXO3a an der Regulation antioxidativer Enzyme beteiligt. Daher wurde die TNF- α vermittelte Regulation der Katalase in Abhängigkeit von FOXO3a betrachtet und folgende Fragestellung untersucht:

- 4) Besteht in den MCF-7 Zellen ein Zusammenhang zwischen Katalase, FOXO3a und der TNF- α vermittelten Sensitivität?

Das Anthrazyklinderivat Doxorubicin ist ein in der Tumortherapie häufig eingesetztes Chemotherapeutikum. Doxorubicin kann durch Hemmung der Topoisomerase II, DNA Interkalation und Quervernetzung DNA Schäden verursachen und als Redox-Zyklus eine vermehrte intrazelluläre ROS-Bildung auslösen. Resistenzen der Tumorzellen nach wiederholter Applikation und Doxorubicin vermittelte Nebenwirkungen sind jedoch häufig limitierende Faktoren bei der Verwendung dieses Chemotherapeutikums. Da Doxorubicin die Akkumulation von ROS in den Zellen induzieren kann, wurde die Rolle von H₂O₂ bei der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität untersucht und die Regulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren durch Doxorubicin charakterisiert. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 5) Hat die Überexpression der Katalase einen Einfluss auf die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität?
- 6) Hat Doxorubicin einen Einfluss auf redox-sensitive Transkriptionsfaktoren?

Die Resistenz von Tumorzellen gegen exogene Stimuli ist häufig mit einer Aktivierung des PI3K/AKT Überlebenssignalweges verbunden. FOXO4, ein weiterer redox-sensitiver Transkriptionsfaktor der FOXO Superfamilie, vermittelt als Gegenspieler des PI3K/AKT Signalweges Zellzyklus Arrest und Apoptose. FOXO4 unterliegt einerseits einer AKT abhängigen inhibitorischen Phosphorylierung, andererseits kann die Akkumulation von ROS in den Zellen zu einer JNK abhängigen transkriptionell aktivierenden Phosphorylierung führen. Da FOXO4 als Tumorsuppressor fungieren kann und im aktiven Zustand die Apoptose aktiviert,

wurde im letzten Teil der vorliegenden Arbeit die Doxorubicin abhängige Regulation des FOXO4 Transkriptionsfaktors und dessen Einfluss auf die Sensitivität der Hct-116 Kolon-Karzinomzellen gegenüber Doxorubicin untersucht. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 7)** Ist der redox-sensitive Transkriptionsfaktor FOXO4 an der Regulation der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität beteiligt?
- 8)** Kann eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO4 Krebszellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin sensibilisieren?

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

Abb	Abbildung	min	Minute
Ak	Antikörper	MnSOD	Mangan Superoxiddismutase
AKT	AKT Kinase	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Amp	Ampicillin	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ANOVA	<i>analyses of varianz</i>	µm	Mikrometer
APS	Ammoniumperoxodisulfat	n	Anzahl der Versuche
AP-1	<i>activator protein-1</i>	NF-κB	<i>nuclear factor kappaB</i>
bp	Basenpaar	NP-40	Nonidet P 40
BSA	Rinderserumalbumin	NR	Neutralrot
cDNA	<i>complementary DNA</i>	nts	Nukleotide
DBE	<i>daf binding element</i>	OD	Optische Dichte
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein	ORF	<i>open reading frame</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PDK-1	<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	PI3K	<i>phosphatidyl inositol 3-kinase</i>
Dox	Doxorubicin	PIP ₂	<i>phosphatidylinositol 4,5-disphosphate</i>
DTT	Dithiothreitol	PIP ₃	<i>phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>
EC ₅₀	<i>effective concentration (50%)</i>	Pfu	<i>proof reading</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
EtBr	Ethidiumbromid	PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
EtOH	Ethanol	RFU	<i>relative fluorescent units</i>
FOXO	<i>forkhead transcription factor, class/box O</i>	RLB	<i>reporter lysis buffer</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>	RNA	Ribonukleinsäure
FGS	<i>fetal goat serum</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
G	Gramm, Erdbeschleunigung	RNase	Ribonuklease
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
GFP	<i>green flurescent protein</i>	rpm	<i>rotations per minute</i>
GTE	Glucose/Tris/EDTA	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
H ₂ -DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein	stbw	Standardabweichung
H ₂ -DCF-DA	H ₂ -DCF-Diacetat	SDS	Natriumdodecylsulfat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	SEAP	sekretierte embryonale alkalische Phosphatase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	sek	Sekunden
IC	Immunzytochemie	SEM	<i>standard error of the mean</i>
IgG	Immunglobulin G	Tab	Tabelle
IκB	<i>Inhibitor of NF-κB</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	TE	Tris-EDTA
IRS	<i>insulin responsive element</i>	TEMED	N, N, N', N', - Tetramethylethylendiamin
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	Tm	<i>melting temperature</i>
pJNK	phosphorylierte JNK	TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Kana	Kanamycin	TNFR-1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1
Kat	Katalase	U	Units
kDa	Kilodalton	V	Volt
kb	Kilobasen	W	Watt
LB-Medium	Luria-Broth-Medium	x	Arithmetisches Mittel
LSD	<i>least significant difference</i>	x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
Lsg	Lösung		
mA	Milliampere		
M	Marker		
MCS	<i>multiple cloning site</i>		

2.2 MATERIAL

2.2.1 Bakterienstämme & Zelllinien

Bakterien:

- DH5 α : (Hanahan 1983)
[F⁻, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, th-1, λ ⁻, recA1, gyrA96, relA1, Δ (argF-lacZya)U196, Φ 80dlacZ Δ M15]

Zelllinien:

- Hct-116 humane Kolon-Karzinom Zellen (Fogh *et al.*, 1977)
- HepG2 humane hepatozelluläre Karzinom Zellen (Knowles *et al.*, 1980)
- MCF-7 humane Mamma-Karzinom Zellen (Soule *et al.*, 1973)

2.2.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pBluescript SK ⁻	Amp ^R ; Klonierungsvektor	Stratagene
pGem-T Easy	Amp ^R ; Klonierungsvektor	Promega
pEGFP-C1	Kana ^R ; Expressionsvektor für Fusionsproteine	Clontech
pcDNA3.1(-)/Zeo	Amp ^R ; Expressionsvektor	Invitrogen
pZeohKatalase	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane Katalase	Lüpertz <i>et al.</i> (2008)
pHA-AKT-DN	Amp ^R ; Expressionsvektor für dominant-negative AKT Kinase, HA-Tag am N-Terminus	Franke <i>et al.</i> (1995)
pMT2-HA-FOXO4 (FOXO4wt(1))	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane FOXO4 cDNA, HA-Tag am N-Terminus	Essers <i>et al.</i> (2004)
pMT2-HA-FOXO4-T447/451A (FOXO4-JNK-mut)	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane FOXO4 cDNA, beide JNK Phosphorylierungsstellen zerstört durch Basenaustausch von Threonin zu Alanin, HA- Tag am N-Terminus	Essers <i>et al.</i> (2004)
pTB701-Flag-FOXO4 (FOXO4wt(2))	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane FOXO4 cDNA, Flag-Tag am N-Terminus	Matzusaki <i>et al.</i> (2005a)
pTB701-Flag-FOXO4triple-mutant (FOXO4-nukleär)	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane FOXO4 cDNA, 3 AKT Phosphorylierungsstellen (T28, S193 and S258) durch Basenaustausch von Threonin zu Alanin zerstört, FOXO4 ist kernlokalisiert; Flag-Tag am N-Terminus	Matzusaki <i>et al.</i> (2005a)
pFOXO3a	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane FOXO3a cDNA, Flag-Tag am N-Terminus	Adgene #10708 (Ramaswamy <i>et al.</i> , 2002)
pFOXO3a-AAA	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane FOXO3a cDNA, 3 AKT Phosphorylierungsstellen (T32, S253 and S315) durch Basenaustausch von Threonin zu Alanin zerstört, FOXO3a ist kernlokalisiert; Flag-Tag am N-Terminus	Adgene #10709 (Ramaswamy <i>et al.</i> , 2002)
pEGFP-FKHR	Kana ^R ; Expressionsvektor für FOXO1-GFP Fusionsprotein	Kortylewski <i>et al.</i> (2003)

3xIRS-Luc (pGL3)	Amp ^R ; Luciferase-Reporter mit 3-fach <i>repeat</i> des "insulin responsive elements" als Enhancer	Matzusaki <i>et al.</i> (2005a)
6xDBE-Luc (pGL3)	Amp ^R ; Luciferase-Reporter mit 6-fach <i>repeat</i> des "daf binding elements" als Enhancer	Essers <i>et al.</i> (2004)
pSE-Luc	Amp ^R ; Luciferase-Reporter mit Selenoprotein-promotor	Mostert <i>et al.</i> (2001)
pSEAP2-control	Amp ^R ; Konstitutiv aktiver Expressionsvektor für SEAP	Clontech
pTAL-SEAP	Amp ^R ; SEAP-Reportervektor als Negativkontrolle oder zur Klonierung und Untersuchung von Enhancern	Clontech
pNF-kB-SEAP	Amp ^R ; SEAP Reportervektor mit 4-fach Tandemkopien der NF-kB konsensus Sequenz	Clontech
pAP-1SEAP	Amp ^R ; SEAP Reportervektor mit 4-fach Tandemkopien des AP1 Enhancers	Clontech
pMyc-SEAP	Amp ^R ; SEAP Reportervektor mit 6-fach Tandemkopien der E-Box	Clontech

neu konstruierte Plasmide:

pZeohmlsKatalase	Amp ^R ; Expressionsvektor für humane Katalase mit 5' mitochondrialer Leadersequenz
3xIRS-SEAP	Amp ^R ; SEAP-Reportervektor mit 3-fach <i>repeat</i> des "insulin responsive elements" als Enhancer
6xDBE-SEAP	Amp ^R ; SEAP-Reportervektor mit 6-fach <i>repeat</i> des "daf binding elements" als Enhancer
pEGFP-FOXO4wt	Kana ^R ; Fusionsprotein aus humanem Wildtyp FOXO4 und EGFP
pEGFP-FOXO4nukleär	Kana ^R ; Fusionsprotein aus humanem „triple mutant“ FOXO4 und EGFP, Kernlokalisiertes FOXO4

2.2.3 Medien & Antibiotika

Bakterien:

LB-Medium	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 85 mM NaCl, pH 7,4 einstellen mit NaOH [1 N]
LB-Agar (Platten)	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 85 mM NaCl, 1,5 % Bacto-Agar, NaOH [1 N] (abkühlen auf 60 °C, Zugabe des Antibiotikums)
LB-Medienzusätze	IPTG: 0,5 mM in dH ₂ O; x-Gal: 0,01 % in DMSO
Antibiotika	Ampicillin 50 µg/ml; Kanamycin 30 µg/ml

Zellkultur:

DMEM-Medium (Hct-116)	+ 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
DMEM (farblos)	+ 10 % hitzeinaktiviertes FCS
RPMI-Medium (MCF7)	+ 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 1 mM Natriumpyruvat, nicht essentielle Aminosäuren (1x)
RPMI-Medium (HepG2)	+ 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2.2.4 Lösungen & Puffer

Acrylamid-Lösung	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Anodenpuffer	200 mM Tris, 20 % MeOH, pH 10,4
APS 10 % [w/v]	1 g APS ad 10 ml dH ₂ O, aliquotiert bei -20°C
Antikörper-Inkubationslsg	5 % Trockenmilch in TBST
Antikörper-Inkubationslsg (für Cell signaling Ak)	1X TBS, 0,1 % Tween-20 + 5 % BSA
Antikörper-Blockierlösung	5 % Trockenmilch in TBST
Assaybuffer (SEAP)	2 M Diethanolamin, 28 mM L-Homoarginin in dH ₂ O
Assaypuffer (Caspase)	55 mM HEPES, 110 mM NaCl, 110 µM EDTA, pH 7,4 frisch ansetzen + 10 mM DTT, 1 mg/ml CHAPS, 10 % [w/v] Glycerin
Coomassie-Entfärbelösung (Membran)	50 % [v/v] Methanol, 1 % [v/v] Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung (Gele)	5 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure
Coomassie-Färbelsg (Membran)	40 ml Ethanol, 2 ml Essigsäure, 0,2 g Coomassie Brilliantblau auffüllen auf 100 ml mit dH ₂ O
Coomassie-Färbelsg (Gele)	45 % [v/v] Methanol, 10 % Eisessig [v/v], 0,2 % [w/v] Coomassie Brilliantblau
CSPD Substrat (SEAP)	25 mM bei 4° im Dunkeln lagern, <i>ready to use</i>
DNA - Auftragspuffer	0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 % [w/v] Xylenyanol, 50 % [v/v] Glycerol, in 1x TBE
dH ₂ O-DEPC	0,1 % Diethylpyrocarbonat in dH ₂ O 12 h rühren, 10 min unter UV Licht, 2x autoklavieren
Dilutionbuffer (SEAP)	50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,4
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA, pH 8,0
Einbettungsmedium	PBS/Glycerol 1:1 + 2,5 mg/ml Propylgallat
Einfriermedium (Zellen)	6,2 ml Zellkulturmedium + 1 ml DMSO, auf Eis
Entwickler (Western Blot) (Kodak GBX <i>developer and replenisher</i>)	250 ml Entwickler Lösung + 750 ml dH ₂ O
EtOH 75 % (RNA Isolation)	75 % Ethanol in dH ₂ O-DEPC
Extraktionslsg. (MTT - Test)	5 % Ameisensäure, 95 % Isopropanol
Extraktionslsg. (NR - Test)	50 % [v/v] EtOH, 1 % [v/v] Essigsäure in dH ₂ O
FCS	105 min 56°C hitzeinaktiviert, Lagerung bei -20°C
FGS-PBS 2 % / 10 %	PBS mit 2 oder 10 % FGS (Frisch ansetzen)
Fixierer (Western Blot)	600 g Natriumthiosulfat, 60 g Kaliumdisulfid ad 2L dH ₂ O
Fixierlösung (NR-Test)	1 % [v/v] Formaldehyd, 1 % [w/v] CaCl ₂
Glycerinstocks (Bakterien)	Sterile Glycerin/Wasser - Lsg, 4:1 [v/v]; autoklavieren
GTE-Lösung	50 mM Glucose, 25 mM TrisHCl pH 8,0, 10 mM EDTA
H ₂ -DCF-DA Stocklsg	50 mM H ₂ -DCF-DA in DMSO
K-Acetat Lösung (5 M)	5 M KOH, 29,5 ml Eisessig, ad 100 ml dH ₂ O
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 20 % Methanol, ε-Aminocapronsäure, pH 9,4
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glycin
Lysepuffer (DNA-Leiter)	10 ml TrisHCl (1 M pH 8,0), 30 ml 20 % [w/v] SDS, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ad 1 L, Lagerung bei 4°C

Lysepuffer (Zellzyklus Analyse)	15 mM Tris, 2 mM Na ₂ EDTA, 0,5 mM Spermintetrahydrochlorid, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1 % [v/v] Triton X-100; pH einstellen auf 7,5 mit 1 N HCl, dann Zugabe von 15 mM β-Mercaptoethanol, filtrieren (0,2 μm), Lagerung 4°C
Lysispuffer (Caspase)	50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 100 μM EDTA, pH 7,4 frisch ansetzen + 1 mM DTT, 1 mg/ml CHAPS
MOPS (10x)	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0
5xMTT Stammlösung	3,5 mg/ml MTT in dH ₂ O filtrieren, lichtgeschützt 4°C
NaCl-Lösung (Transfektion)	150 mM NaCl in dH ₂ O
NaCl-Lösung (DNA-Leiter)	5 M NaCl
NaOH – SDS	0,2 M NaOH, 1 % [w/v] SDS
Neutralrotlösung1	0,4 % in H ₂ O
Neutralrotlösung2	0,1 % (w/v) Neutralrot in dH ₂ O + 2 Tropfen Eisessig
NP-40 10 %	10 % [v/v] in dH ₂ O
NR-Medium1	10 mM Hepes, NR-Lsg2 1:12,5 in Zellkulturmedium
NR-Medium2	100 mM Hepes, NR-Lsg1 1:10 in Zellkulturmedium
Paraformaldehyd 4 %	4 % Paraformaldehyd in PBS
10 x PBS	1,36 mM NaCl, 26 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄
PBST 0,2 %	PBS mit 0,2 % Triton X-100 Zusatz (frisch ansetzen)
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	(19:1:1) 19 ml Phenol, 1 ml Chloroform, 1 ml Isoamylalkohol
50 mM Phosphatpuffer pH 7	Lsg1: 6,81 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L; Lsg2: 8,9 g Na ₂ HPO ₄ ad 1 L; mit Lsg1 pH auf 7,0 bei Lsg2 einstellen
Ponceau-S Färbelsg.	2 g Ponceau Rot S, 30 g Sulfosalicylsäure, 60 ml 50 % Trichloressigsäure, ad 100 ml dH ₂ O
Propidiumiodid	1,5 mM (1mg/ml) in dH ₂ O, filtrieren (0,2 μm), Lagerung in Aliquots bei -20°C
Puffer A (Zytosolfraktion)	10 mM HEPES, 10 mM KCl, 100 μM EDTA, 100 μM EGTA, 1 mM PMSF, 1x Proteinase Inhibitor Cocktail, 1 mM DTT, 10 mM NaF
Puffer B (Kernfraktion)	20 mM HEPES, 400 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM PMSF, 1x Proteinase Inhibitor Cocktail, 1 mM DTT, 10 mM NaF
RIPA – Puffer	50 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % [w/v] NP40, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Deoxycholat
RIPA-Gebrauchspuffer	RIPA-PUFFER + 1 mM PMSF (aliquotiert, -20°C), 1xProteinase Inhibitor Cocktail (aliquotiert, -20°C)
RNA Auftragspuffer	900 μl Formamid, 100 μl 10x MOPS, 161 μl 37 % Formaldehyd, 20 μl Bromphenolblau 1 %, 20 μl Xylenyanol 1 %, 10 μl [10 mg/ml] EtBr
RNAse A	10 mg RNAse A in 1 ml Wasser, sterilfiltrieren, 15 min bei 90°C denaturiert, Lagerung in Aliquots bei -20°C
Sammelgelpuffer (2x)	250 mM Tris, 0,2 % [w/v] SDS, pH 6,8
SDS 10 % oder 20 % [w/v]	100 g oder 200 g SDS ad 1 L H ₂ O unter langsamem Rühren lösen
SDS – Laufpuffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS

SDS – Probenpuffer (4x)	40 % [w/v] Glycerin, 20 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 12 % [w/v] SDS, 0,4 % Bromphenolblau
TBE (5x)	0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
TBS (10x)	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4
TBST	1x TBS + 0,1 % [v/v] Tween 20
TE - Puffer	10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris, 0,4 % [w/v] SDS, pH 8,8
TrisHCl pH 8,0	0,1 M Trizma [®] -Base

2.2.5 Molekulargewichtsstandards

DNA-Marker:	<u>Gene Ruler[®] 1 kb DNA ladder:</u> 10000 / 8000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3500 / 3000 / 2500 / 2000 / 1500 / 1000 / 750 / 500 / 250 bp (MBI Fermentas)
	<u>Gene Ruler[®] 100 bp DNA ladder:</u> 1031 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100 / 80 bp (MBI Fermentas)
Proteinmarker:	<u>Page Ruler[®] Protein ladder:</u> 200 / 150 / 120 / 100 / 85 / 70 / 60 / 50 / 40 / 30 / 25 / 20 / 15 / 10 kDa, unstained (MBI Fermentas)
	<u>Page Ruler[®] Prestained Protein ladder:</u> 170 / 130 / 100 / 72 / 55 / 40 / 33 / 24 / 17 / 11 kDa (MBI Fermentas)

2.2.6 Synthetische Primer

Gen	Primersequenz	TM (°C)	Größe (Bp)
5'-GAPDH	5' – ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC – 3'		
3'-GAPDH	5' – TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA – 3'	60	450
5'-hKatalase	5' – TCA GCT GAC ACA GTT CG – 3'		
3'-hKatalase	5' – GGT GAG ATC GAA TGG AT – 3'	54	550
5'-hMnSOD	5' – CCT GAA CGT CAC CCG AGG AGA A – 3'		
3'-hMnSOD	5' – CTG CAG TAC TCT ATA CCA CTA CA – 3'	62	630
5'-hA20	5' – TCG ACA GAA ACA TCC AGG CCA C – 3'		
3'-hA20	5' – ATT GGC CTT CTG AGG ATG TTG C – 3'	62	415
5'-hBax	5' – CCA AGA AGC TGA GCG AGT GTC TC – 3'		
3'-hBax	5' – AGT TGC CGT CTG CAA ACA TGT CA – 3'	60	147
5'-hBCI-XL	5' – CAT GGC AGC AGT AAA GCA AGC G – 3'		
3'-hBCI-XL	5' – AGG CTC TAG GTG GTC ATT CAG G – 3'	60	295
5'-hXIAP	5' – TGG CAA TAT GGA GAC TCA GC – 3'		
3'-hXIAP	5' – TGC ACT TGG TCA CCA ATA CC – 3'	56	380
5'-h-p21Waf1	5' – AGT GGA CAG CGA GCA GCT GA – 3'		
3'-h-p21Waf1	5' – TAG AAA TCT GTC ATG CTG GTC TG – 3'	62	380
5'-BimEL	5' – GTA ATC CTG AAG GCA ATC ACG GAG – 3'		
3'-BimEL	5' – ATA GTG GTT GAA GGC CTG GCA A – 3'	58	250
5'-hFOXO4	5' – AGT CTG AGG TGC TGG CGG AG – 3'		
3'-hFOXO4	5' – GGT GGT GGC GTA TCA GAG GTG – 3'	62	300
5'-hFOXO3a	5' – CTT CAA GGA TAA GGG CGA CAG – 3'		
3'-hFOXO3a	5' – TCG TCC TGG ACT TCA TCC AAC – 3'	66	450
5'-hFOXO1	5' – GCA GAT CTA CGA GTG GAT GGT C – 3'		
3'-hFOXO1	5' – AAA CTG TGA TCC AGG GCT GTC – 3'	62	325
5'-hMDR1	5' – CAT TGG TGT GGT GAG TCA GG – 3'		
3'-hMDR1	5' – ACC ACT GCT TCG CTT TCT GTT – 3'	62	300
5'-hp53	5' – CCT CAC CAT CAT CAC ACT GG – 3'		
3'-hp53	5' – TTA TGG CGG GAG GTA GAC TG – 3'	60	390

Klonierungsprimer:

hmls-hyb	5' – ATC CCG GCT GTC AGC CAT CTG CCT GGA GCG GCG A – 3'	52	
5'-hmls- <i>Xba</i> I	5' – TCT AGA ATG TTG AGC CGG GCA GTG – 3'	52	
3'-hmls	5' – CTG CCT GGA GCC CAG ATA C – 3'	52	96
5'-FOXO4-ORF- <i>Xho</i> I	5' – ATA CTC GAG TAA TGG ATC CGG GGA ATG AGA – 3'		
3-FOXO4-ORF- <i>Pst</i> I	5' – ATA CTG GAG TCA GGG ATC TGG CTC AAA GTT – 3'	65	1538
5'-hKatalase-ORF	5' – TCA GCT GAC ACA GTT CG – 3'	52	
3'-hKatalase-ORF	5' - TCA CAG ATT TGC CTT CTC CCT – 3'	52	1584

Die Primer wurden von Operon Biotechnologies oder Invitrogen™ synthetisiert.

2.2.7 Antikörper**Primär-Antikörper**

Zielprotein	Hersteller/Firma	Ver- dünnung	Größe (kDa)
p53	11-114-C020, Exbio	2 µg/ml	53
pp53 (Serin 392)	11-467-C100, Exbio	2 µg/ml	53
p21Waf1	11-338-C100, Exbio	2 µg/ml	21
Katalase	219010, Calbiochem	1:2000 1:50 (IC)	56
MnSOD	06-984, upstate cell signaling solutions	1:1250	24
Bax	2281-MC-025, Trevigen	1:2500	21
FOXO3a	9467, Cell Signaling	1:1000	82 bis 97
FOXO4	2499, Cell Signaling	1:1000	65
FOXO1/FOXO4 (unphosphoryliert)	9462, Cell Signaling	1:1000	78 bis 82
pFOXO1 (Thr24)/ pFOXO3a (Thr32)	9464, Cell Signaling	1:1000	78 bis 82, 95
pFOXO4 (Ser193)	9471s, Cell Signaling	1:1000	70
NF-κB	Sc-109, Santa Cruz Biotechnology 3034, Cell Signaling	1:500 1:1000	65
AKT	P2484, Sigma	1:10000	56
pAKT (Ser473)	9271s, Cell Signaling	1:1000	60
PTEN	P3487, Sigma	1:500	55
PI-3K (p85β)	MCA1170G, Serotec	1:4000	85
JNK1	06-748, upstate cell signaling solutions	1:500	46

pJNK (Thr183/Tyr185)	9251, Cell Signaling	1:1000	46 + 52
GFP	AHP-975, Serotec	1:500	27
HA-Antikörper	H3663, SIGMA	1:1000	

Sekundär-Antikörper

Goat-anti-mouse IgG	HRP Konjugat, Serotec	1:2000	
Goat-anti-rabbit IgG	HRP Konjugat, Southern Biotechnology	1:2000/ 1:5000	
Pig-anti-Goat	HRP-Konjugat, Biocarta	1:2000	
Goat-anti-rabbit IgG	Rhodamin Konjugat, Calbiochem	1:200	

2.2.8 Enzyme & Substrate

Restriktionsendonukleasen:	<i>BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, MluI, PstI, XbaI, XhoI</i>	(MBI Fermentas)
Alkalische Phosphatase (CIAP)	1 U/μl	(MBI Fermentas)
Taq-Polymerase	5 U/μl	(Promega)
Go-Taq Polymerase	5 U/μl	(Promega)
Pfu-Taq Polymerase	2,5 U/μl	(MBI Fermentas)
Ribonuclease Inhibitor	40 U/μl	(MBI Fermentas)
M-MLV Reverse Transkriptase	200 U/μl	(Promega)
T4 – Ligase	400 U/μl	(Biolabs, Fermentas, Promega)
RNase	70 U/mg	(Serva)
DNase	4710 U/mg	(Fluka)

2.2.9 Transfektionsreagenzien

JetPEI™ DNA Transfection Reagent (Polyplus Transfection)

GeneJuice® Transfection Reagent (Novagen)

2.2.10 Chemikalien

Acridinorange	Sigma	Borsäure	Merck
Acrylamid-Lösung (37,5:1)	Merck	BSA Proteinstandard	Bio-Rad
Agarose Neo Ultra	Roth	Bradford Reagenz	Bio-Rad
Ameisensäure	Roth	Bromphenolblau	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	Merck	Calciumchlorid	Merck
Ampicillin	ICN	Caspasesubstrate	ICN
APO-ONE® Homogenous	Promega	CHAPS	Fluka
Caspase-3/-7 Assay		Chloroform	Merck
Bacto-Agar	Becton Dickinson	Coomassie Brilliantblau R250	Serva
		(Serva Blau®)	
Bacto-Hefe Extrakt	Becton Dickinson	CSPD Substrat	Tropix
		dATP, dCTP, dGTP, dTTP	MBI
Bacto-Trypton	Becton Dickinson	DEPC	Fermentas
		Deoxycholat	Sigma
Bio-Rad DC Protein Assay	Bio-Rad		Sigma

Diethanolamin	Fluka	MOPS	GIBCO BRL
Dimethylformamid	Merck	MTT	Sigma
Dithiotreitol	Sigma	MultiTox-Fluor Multiplex	Promega
DMEM (farblos)	GIBCO	Cytotoxicity Assay	
DMEM (<i>high glucose</i> , L-Glutamin, Phenolrot)	GIBCO	NaCl	Merck
DMSO	Merck	Natriumacetat	Merck
Doxorubicin	Pharmacia	Na ₂ EDTA	Sigma
BM Chemiluminescence Western Blotting Kit	Roche	NaOH	Merck
	Applied Sciences	Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	PIERCE	Natriumthiosulfat	Merck
EDTA	ICN	Natriumfluorid	Merck
EGTA	Serva	Natriumpyruvat	Sigma
Eisessig	Merck	Neutralrot	Sigma
Entwickler	Kodak	NF-κB ELISA Kit	Active Motif
Ethanol	Merck	nicht-essentielle Aminosäuren	GIBCO
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth	Nonidet-P40	Fluka
FBS	Calbiochem	Paraformaldehyd	Merck
FCS gold	PAA Laboratories	PCR Purification Kit	Qiagen
Formamid	Merck	Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Formaldehyd 37 % [v/v]	Roth	Phenol (Rotiphenol®)	Merck
Gel Extraktion Kit	Qiagen	PMSF	Sigma
Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System	Promega	Plasmid Kit	Qiagen
pGem-T® Easy Vector System I	Promega	n-Propylgallat	Sigma
Glucose D(+)	Merck	Ponceau-S	Sigma
Great Escape Chemilumi- nescent Detection Kit	Clontech	Proteinase Inhibitorcocktail 10x	Calbiochem
Glycerol (≥99,5 %)	Roth	Propidiumiodid	Sigma
Glycin	Roth	RNAse A	Serva
H ₂ DCF-DA	Sigma	Rotiphorese Gel 30	Roth
H ₂ O ₂ 30%	Roth	RPML (L-Glutamin, Phenolrot)	PAA Laboratories
Hepes	Sigma	Salzsäure 37 % [v/v]	Merck
Hoechst 33342	Sigma	SDS	Serva
L-Homoarginin	Fluka	Spermintetrahydrochlorid	Sigma
hTNF-α	Pepro Tech Inc.	Stripping Buffer	PIERCE
	Promega	TEMED	Serva
IPTG	Merck	Tris-Base	Sigma
Isoamylalkohol	Merck	Trichloressigsäure	Merck
Isopropanol	Merck	TrisHCl	ICN
Kaliumchlorid	Merck	Triton X-100	Sigma
Kaliumdisulfit	Merck	Trizol (Tri®Reagent)	Sigma
Kanamycin	Sigma	Trockenmilch (Nonfat-Dried Milk - Bovine)	Sigma
KH ₂ PO ₄	Merck	Trypsin (0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA – HNa)	GIBCO
6x Loading dye (green)	MBI Fermentas	Tween 20	MP Bio- chemicals
Luciferase Assay Kit	BioThema	X-Gal	MBI Fermentas
Methanol	Roth	Xylenxyanol	Merck
Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells	PIERCE	β-Mercaptoethanol	Merck
		ε-Aminocaprionsäure	Sigma

2.2.11 Geräte

Geldokumentationsanlage 2000	BIO-RAD, Geldoc 2000
Thermoprinter	Mitsubishi P91
Blotting Apparaturen	Biometra, Pharmacia LKB Multiphor II OWL HEP-1, Thermo Scientific Peqlab
inverses Lichtmikroskop	Axiovert 100, Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Axiolab, Zeiss
Zentrifugen	Hettich R 24 – 48 Hettich universal 30F Eppendorf 5415R Jouan MR 18 12 Beckman Microfuge R Beckman Coulter Avant J – 25 Minifuge2, Heraeus Christ
FACS	FACScalibur FACScantoll
Kamera Fluoreszenzmikroskop	CoolSNAP-Pro (INAS)
Digitalkamera	CANON Digital IXUS 75
Photometer	Lambda 25 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer Lambda 12 UV/VIS spectrometer, Perkin Elmer
PCR Cycler	Biometra T Personal Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400
Realtime PCR Cycler	AB7300, Applied Biosystems
Heizblock	Ori-Block® DB-3, Techne Dry Bath System, Starlab
pH - Meter	Radiometer Copenhagen PHM 93
Plattenlesegerät	Wallac Victor 1420 Multilable Counter, Perkin Elmer
Power Supply	E143, Consort EV231, Consort E835, Consort PS3002, GIBCO BRL Life Technologies
Inkubator	Jouan IG 150 Binder Serie BC
Sterilbänke	Jouan IC2.12 Gelaire BSB4
Schüttler	Swip, Edmund Bühler (EB) Roto-Shake Genie, Scientific Industries
Rührer	Heidolph MR2002
Bakterienschüttler	INFORS AG CH-4103
Eismaschine	Icematic F90, Compact Electronics
Waage	Sartorius 3716MP Sartorius Analysenwaage MC1
Wasserbad	W22, Mendingen Thermomix_1420, B. Braun Certomat WR, B. Braun Köttermann
Wasser-Deionisierungsanlage	Millipore

2.2.12 Sonstige Materialien

Proteinmembranen	PVDF Western Blotting Membranes, Roche
Filme	Kodak X-OMAT AR Film XAR-5 CL-X Posure™ Film, Thermo Scientific
Membranfilter	Porengröße 0,22 und 0,4 µm, Santorius

Zählkammer Fuchs - Rosenthal
 Chromatographie Papier 3MMCHR, Whatman

2.2.13 Computerhardware und -software

Quantity One 4.1.0	Bio Rad
Clone Manager Vers. 4.0	Scientific & Educational Software
Word, Excel, Powerpoint, Photo Editor	Microsoft Corporation (Version 2003)
Statistica Version 5.0	Stata Soft Inc.
Wallac 1420 Workstation	Perkin Elmer
Relative Expression Software Tool“ (REST©)	Pfaffl, 2001; Pfaffl <i>et al.</i> , 2002, 2004
Tina 2.0	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Reference Manager 10	ISI ResearchSoft
Image Pro Plus, Version 4.5.1.22	Media cybernetics
UV-Winlab	Perkin Elmer
CorelDrawGraphicsSuite12	Macrovision Corporation
Roxio Photosuite5	1996-2003 Roxio Inc.
Sequence Detection Software, Version 1.2.3	AB Applied Biosystems
WinMDI 2.8	1993 - 1998 Joseph Trotter

2.3 METHODEN

2.3.1 Zellkultur

a) Hct-116 Zellen (Passage 10 – 30) wurden mit einer Dichte von $1,1 \times 10^5$ Zellen/cm² kultiviert. Als Gefäße wurden T75 Kulturflaschen, 24-, 12-, 6- und 96-Wellplatten, sowie 35 oder 60 mm Schalen verwendet. Die Hct-116 Zellen wurden in DMEM Komplettmedium kultiviert (DMEM High Glucose, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Kulturgefäße wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Da bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen eine Kontaktinhibition auftritt, erfolgte die Subkultivierung alle 7 Tage. Die konfluenten Zellen wurden zuvor lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer 0,5 %-igen Trypsin/EDTA Lösung. Nach Entfernen des Mediums wurde 1 ml Trypsin/EDTA pro T75 Kulturflasche zugegeben. Danach wurden die Zellen für 1 - 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 560 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde, nach lichtmikroskopischer Bestimmung der Zellzahl, mittels einer Fuchs–Rosenthal Zählkammer, in einem definierten Volumen DMEM aufgenommen und erneut ausplattiert.

b) HepG2 Zellen (Passage 10 - 30) wurden mit einer Dichte von $1,6 \times 10^5$ Zellen/cm² kultiviert. Als Gefäße wurden T75 Kulturflaschen, 6- und 96-Wellplatten verwendet. Die HepG2 Zellen wurden in RPMI Medium kultiviert (RPMI, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Kulturgefäße wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

c) MCF-7 Zellen (Passage 5 – 25) wurden mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/cm² kultiviert. Als Gefäße wurden T75 Kulturflaschen, 24-, 12-, 6- und 96-Wellplatten, sowie 35 oder 60 mm Schalen verwendet. Die MCF7 Zellen wurden in RPMI Medium kultiviert (RPMI, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 1x nicht-essentielle Aminosäuren). Die Kulturgefäße wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.3.2 Inkubation/Schädigung der Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit Zellzahlen von 1×10^4 - 4×10^4 auf 96-Wellplatten, oder 1×10^6 - 2×10^6 auf 6-Wellplatten ausplattiert. 24 h nach Ausplattieren der Zellen wurden verschiedene Konzentrationen an Noxen oder frisches Medium zu den Zellen gegeben und für weitere 1 bis 48 h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen weiter bearbeitet.

2.3.3 Einfrieren & Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde für alle Zelllinien die Zellsuspension auf 2 - 10 Millionen Zellen/ml eingestellt. 0,5 ml der Zellsuspension wurden mit 0,6 ml DMSO-Medium (6,2 ml Medium + 1 ml DMSO) in einem Kryoröhrchen gemischt. Die Kryoröhrchen wurden 15 Minuten auf Eis und 2 h bei -20°C inkubiert. Abschließend wurden die Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen schnell zwischen den Handflächen gerieben, bis die Suspension fast aufgetaut war. Die Zellsuspension wurde in 20 ml frischem Medium in einer T75 Kulturflasche aufgenommen. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

2.3.4 Mikroskopie von Zellen

2.3.4.1 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Analyse erfolgte am Zeiss Axiovert 100. 1×10^6 Zellen wurden auf 6-Well oder 35 mm Schalen ausplattiert und 24 h später mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen im Lichtmikroskop betrachtet und bei 32x Objektiv-Vergrößerung mittels einer Digitalkamera der Habitus der Zellen aufgenommen.

2.3.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde am Zeiss AxioLab Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Wie bei der Lichtmikroskopie wurden die Zellen ausplattiert, inkubiert und bei 40x Objektiv-Vergrößerung betrachtet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer schwarz-weiß Kamera (CoolSnap) und die Auswertung über Image-Pro plus (Media cybernetics). Bei Bedarf wurden die Bilder in der Nachbearbeitung eingefärbt.

2.3.5 Zytotoxizität

2.3.5.1 MTT-Test

Das Prinzip des MTT Assays beruht darauf, dass das lösliche gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch die Aktivität der mitochondrialen Hydrogenasen mittels Reduktion in das lösliche blaue Formazan umgewandelt wird. Über das Absorptionsmaximum des Formazans bei 562 nm lässt sich die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und somit die Viabilität der Zellen bestimmen. Die Viabilität der Zellen wurde nach Behandlung mit verschiedenen Noxen bestimmt. Die Zellen wurden 1 h mit 1x MTT-Gebrauchslösung bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach vorsichtigem Entfernen der MTT-Lösung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und das gebildete Formazan mit der MTT-Extraktionslösung aus den Zellen herausgelöst. Die Quantifizierung des Formazans erfolgte über die Messung der Farbintensität bei 560 nm im Plattenlesegerät. Für die Viabilitätsmessung auf 24- oder 12-Wellplatten wurden jeweils 100 μl der extrahierten Lösung (3-fach Bestimmung) in 96-Wellplatten umpipettiert (Mosmann *et al.*, 1983).

2.3.5.2 Neutralrot-Test

Nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Noxen wurde die Viabilität der Zellen mittels des Neutralrottests bestimmt (Borenfreund und Puerner, 1986). Neutralrot ist ein leicht basischer Farbstoff, der die Eigenschaft besitzt, in ungeladener Form Membranen passieren zu können. In den Lysosomen, die einen sauren pH besitzen, wird das Neutralrot protoniert und kann nun nur noch sehr schlecht die Membranen passieren. Es reichert sich in den Lysosomen an, so dass die Zellen rot gefärbt erscheinen. Tote Zellen dagegen haben keine intakte Membran, sodass das Neutralrot wieder ausgewaschen werden kann.

Die Durchführung des Neutralrottests erfolgte nach Borenfreund und Puerner (1986). Dazu wurden die Zellen 2 h mit Neutralrotmedium1 (10 mM Hepes, 50 µg/ml Neutralrot (aus Neutralrotlösung1) in Zellkulturmedium) inkubiert (96-, 12- oder 24-Wellplatten).

Aufgrund von Kristallbildung in den Wells wurde zusätzlich das Neutralrot-Medium2 verwendet (100 mM Hepes, Neutralrotlösung2 (0,1 % (w/v) Neutralrot in dH₂O + 2 Tropfen Eisessig) 1:10 in Zellkulturmedium). Die Zellen wurden ebenfalls für 2 h bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die jeweilige Farbstofflösung abgenommen und die Zellen mit Fixierlösung fixiert. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wurde mittels einer Extraktionslösung der Farbstoff aus den lebenden Zellen herausgelöst. Nach 0,5 - 1 h Extraktionszeit wurden die Überstände bei 560 nm im Plattenlesegerät gemessen. Für die Viabilitätsmessung auf 24- oder 12-Wellplatten wurden jeweils 100 µl der extrahierten Lösung (3-fach Bestimmung) in 96-Wellplatten umpipettiert.

2.3.5.3 Multi-Tox Fluor Assay

Die Menge an viablen und toten Zellen wurde mittels des „*Multi-Tox Fluor Assay*“ von Promega nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in 96-Wellplatten im Plattenlesegerät (tote Zellen: Ex: 485 nm, Em: 535 nm; viable Zellen: Ex: 355 nm, Em: 510 nm).

2.3.6 Zell-Zyklus Analyse

Zur Analyse des Zellzyklus wurden die zu analysierenden Zellen nach Ende der Inkubationsphase zusammen mit dem Zellüberstand aufgenommen und pelletiert (2 min, 5000xg). Wahlweise wurden die Zellen wie unter Punkt 2.3.3 erwähnt eingefroren, oder direkt weiter bearbeitet. Das Pellet wurde in 1x PBS resuspendiert und nach Zählung wurden 1×10^6 Zellen mit 500 µl Lysepuffer versetzt. Die Suspension wurde in FACS-Röhrchen überführt und mit 5 µl RNase (Stock: 10 mg/ml) und 5 µl Propidiumiodid (Stock: 1,5 mM) versetzt. Die Proben wurden für 1 h bei 4°C inkubiert und danach mittels Durchflusszytometrie analysiert (Dorn *et al.*, 2008).

2.3.7 Wachstumskurve

Um die Teilungsrates der Zellen zu bestimmen, wurden 5×10^3 Zellen auf 96-Wellplatten ausplattiert und für 96 h inkubiert. Der Anteil an viablen Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 6 Tagen, mithilfe des MTT-Tests ermittelt.

2.3.8 Immunzytochemie

Mithilfe spezifisch bindender Primär-Antikörper wurde über einen Protein-Antikörperkomplex und den daran bindenden fluorophorgekoppelten Sekundär-Antikörper die Expression von Proteinen in Zellen nachgewiesen. Dazu

wurde ein steriles 24x32 mm Deckglas in einem 6-Well versenkt. 1×10^6 Zellen wurden pro 6-Well ausplattiert und über den gewünschten Zeitraum inkubiert. Nach Ende der Inkubation erfolgte die Umsetzung mit den jeweiligen Antikörpern. Dazu wurde das mit Zellen bewachsene Deckglas in ein frisches 6-Well überführt und 2x mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei RT. Alle weiteren Waschschrte wurden unter leichtem Schütteln für 10 min durchgeführt. Nach zwei Waschschrten mit 1x PBS wurden die Zellen permeabilisiert (0,2 % PBST, 30 min, RT unter leichtem Schütteln). Es wurde erneut 3x gewaschen (2 % FGS/PBS) und anschließend wurden unspezifische zelluläre Bindungsstellen mittels 10 % FGS/PBS für 30 min unter leichtem Schütteln blockiert. Die Primär-Antikörperinkubation erfolgte mit 100 μ l Lösung (primärer Antikörper in AK-Verdünnungslösung 1:50), die vorsichtig in die Mitte des Deckgläschens pipettiert wurde, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C für 1 h. Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden, wurde die Inkubation auf angefeuchtetem Filterpapier in einer vorgewärmten und dicht verschlossenen Kunststoffdose durchgeführt. Nach 3 weiteren Waschschrten mit 2 % FGS/PBS erfolgte die Inkubation mit fluorophorgekoppeltem Sekundär-Antikörper ebenfalls für 1 h bei 37°C (sekundär Antikörper 1:200 in AK-Verdünnungslösung). Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen vorsichtig mit dem Zellrasen nach unten auf 25 μ l Einbettungslösung betropfte Objektträger gelegt. Diese wurden dann mit farblosem Nagellack versiegelt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.3.9 Transiente Transfektion

Bei einer transienten Transfektion wird die DNA nur vorübergehend in die Empfängerzellen eingebracht. Die transfizierte DNA bleibt dabei extrachromosomal und wird daher nicht regelmäßig an die nächste Zellgeneration weitergegeben. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von kationischen Reagenzien nach einem Batch Protokoll, das für alle Zellen in Suspension etabliert wurde. Verwendet wurden die beiden Transfektionsreagenzien JetPEITM und GeneJuice[®] mit den folgenden DNA/Reagenz Bedingungen:

JetPEITM:		GeneJuice[®]:	
Zelllinie	N/P Ratio	Zelllinie	DNA:Reagenz
Hct-116	5	HepG2	1:2
MCF7	5	MCF7	1:2
		Huh7	1:2

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Zellkulturformate und Bedingungen für das Transfektionsreagenz JetPEITM. Für die JetPEITM Batch Transfektion wurde für DNA und Reagenz jeweils die erforderliche Menge an 150 mM NaCl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt. Nach Zugabe von DNA und JetPEITM in das jeweilige Gefäß wurde kurz durch vortexen gemischt, dann die JetPEITM Lösung zu der DNA Lösung pipettiert und erneut durch vortexen gemischt. Die Komplexbildung erfolgte für 30 min bei RT. Währenddessen wurde die benötigte Menge an Zellen in einem Falcon auf ein ausreichendes Endvolumen mit Medium eingestellt. Nach 30 min Inkubationszeit wurde die DNA/JetPEITM-NaCl Mischung zu der Zellsuspension gegeben und durch vortexen eine homogene Mischung hergestellt. Die jeweilige in Tabelle 1 angegebene Medium Menge wurde dann pro Well oder Kulturschale ausplattiert.

Tabelle1: JetPEI™ Transfektions Bedingungen

Plattenformat	Wellgröße [cm ²]	DNA [µg]	Jetpei [µl]	NaCl Volumen [µl/Well]	Zellzahl	Medium/Well [µl]
96-Well	0,3	0,25	0,5	10-20	1-2x10 ⁴	100
24-Well	1,9	1	2	50	1x10 ⁵	1000
12-Well	3,8	2	4	50-100	2x10 ⁵	1500
6-Well/35mm	9,4	3	6	50-100	1-2x10 ⁶	3000

Für die Komplexbildung, unter Verwendung des GeneJuice® Transfektionsreagenz, wurden 100 µl Medium ohne Zusätze in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß vorgelegt. Die benötigte Menge an GeneJuice® (Tabelle2) wurde zugegeben und für 5 min bei RT

Tabelle2: GeneJuice® Tranfektionsbedingungen

Plattenformat	Wellgröße [cm ²]	DNA [µg]	Genejuice [µl]	Medium [µl] Gesamtvolumen	Zellzahl	Medium/Well [µl]
96-Well	0,3	0,1	0,2	100	1-2x10 ⁴	100
24-Well	1,9	0,5	1	100	1x10 ⁵	1000
12-Well	3,8	1	2	100	2x10 ⁵	1500
6-Well/35mm	9,4	2,5	5	100	1-2x10 ⁶	3000

inkubiert. Nach Ablauf von 5 min wurde die benötigte Menge an DNA zu dem Medium/GeneJuice® Gemisch pipettiert und mit Hilfe der Pipette gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde dann für weitere 10 - 15 min bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde der Ansatz genauso wie bei der JetPEI™ Transfektion in eine bereits vorbereitete Zellsuspension pipettiert, durch vortexen gemischt und die in Tabelle2 angegebenen Volumina pro Well ausplattiert. Die nicht transfizierten Wildtyp Zellen wurden genauso wie die zu transfizierenden Zellen als Suspension in einem Falcon angesetzt, vor dem Ausplattieren gevortext und mit den gleichen Endvolumina wie die transfizierten Zellen auf die Wells ausgesät. Die Inkubation mit den jeweiligen Noxen erfolgte 24 - 72 h nach der Transfektion.

2.3.10 Reporter Assays

In der vorliegenden Arbeit wurden die Luziferase und die sekretierte embryonale alkalische Phosphatase (SEAP) als Reporter verwendet.

2.3.10.1 Luciferase Assay (Promega/Biothema)

Im Luziferase (Luc)-Assay wird das rekombinante Gen des Enzyms Luziferase aus dem Leuchtkäfer als Reporter gen unter Expressionskontrolle eines spezifischen Promotors verwendet. Die Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgt durch eine Biolumineszenzreaktion, die mithilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Die Zellen wurden, nach Transfektion mit einem Luziferase Reporter Plasmid und jeweiliger Inkubation, 2x mit 1x PBS gewaschen und mit 1x Reporter Lysis Buffer (Promega) in den Wells für ca. 10 - 15 min lysiert. Die noch nicht lysierten Zellen wurden mithilfe einer umgedrehten Pipettenspitze vom Boden der Wells abgekratzt. Das Lysat wurde komplett abgenommen und für 1 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. 20 µl Probe wurde mit 100 µl Luziferase Substrat und 100 µl ATP-Lösung (BioThema) versetzt und die Lumineszenz in einem Plattenlesegerät gemessen. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte über die Proteinmenge in den Proben, die über eine Proteinbestimmung gemessen wurde.

2.3.10.2 SEAP Assay (Clontech/Tropix)

Die Verwendung eines SEAP-Reportervektors hat den Vorteil, dass die „sekretierte embryonale alkalische Phosphatase“ nach ihrer Bildung in den Zellüberstand sekretiert wird und so direkt ohne Lyse der Zellen aus dem Zellüberstand gemessen werden kann. Daher wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Aliquots des Zellüberstands zur Messung abgenommen.

Nach Transfektion und Inkubation der Zellen für unterschiedliche Zeiträume wurden Aliquots des Überstandes abgenommen und nach Angaben des Herstellers „*Great Escape Chemiluminescent detection kit*“ (Clontec) oder „*CSPD ready to use*“ (Tropix) aufgearbeitet. Eine Verfälschung der Messergebnisse durch die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatasen wird über eine Hitzeinaktivierung bei 65°C und durch Verwendung des Phosphatase Inhibitors L-Homoarginin vermieden. Die SEAP ist sowohl hitzestabil als auch resistent gegen L-Homoarginin und deaktiviert daher nur die endogenen Phosphatasen. Die Lumineszenz wurde im ELISA-Plattenlesegerät über 40 min gemessen. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte mittels Viabilität nach MTT-Assay oder Proteinmenge nach Proteinbestimmung.

2.3.11 Apoptosenachweis

Zur Messung der bei der Apoptose aktivierten proteolytischen Enzyme, den sogenannten Caspasen, wurden 2 Assays durchgeführt.

2.3.11.1 Caspase Assay

Für den Caspase Assay wurden die Zellen, die zuvor auf 6-Well oder 60 mm Schalen ausgesät und inkubiert wurden, abtrypsinisiert und mit dem Mediumüberstand vereinigt. Nach Zentrifugation und 2 Waschschritten mit 1x PBS wurde das Pellet zur Lyse für mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren und danach in Lyse-Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden danach 15 min bei 4°C mit einem Metallrührer zusätzlich lysiert. Der nach Zentrifugation (15 min, 10000 x g, 4°C) erhaltene Überstand wurde 1:5 verdünnt und die Proteinkonzentrationen wurden mittels Lowry bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

Zur Bestimmung der Caspase Aktivität wurden Caspase Substrate benutzt, die für bestimmte Caspasen spezifische Schnittstellen tragen und mit p-Nitroanillin konjugiert sind. Die Prozessierung dieser Substrate führt zur Freisetzung von p-Nitroanillin, welches bei 405 nm in einem Photometer detektiert wurde. 50 - 150 µg Protein wurden in einem Endvolumen von 90 µl Assaypuffer in 96-Well vorgelegt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl des jeweiligen Caspase Substrats (1:5 verdünnt in Assaypuffer) wurden die Platten erneut bei 37°C inkubiert. Messwerte wurden nach 3 h und 24 h bei 405 nm im Plattenlesegerät aufgenommen. Der Anstieg an p-Nitroanillin ist direkt mit dem Anstieg der Caspase-Aktivität korreliert.

2.3.11.2 APO-ONE Assay

Das „*APO-ONE Assay*“ von Promega zur Messung der Caspase-3/-7 Aktivität wurde nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten durchgeführt. Vor Zugabe des Substrates erfolgte eine Volumenreduktion auf 50 µl. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Plattenlesegerät (Ex: 485 nm, Em: 535 nm).

2.3.11.3 DNA-Fragmentationsanalyse

Die DNA-Fragmentationsanalyse, auch DNA-Leiter genannt, dient ebenfalls dem Nachweis der Apoptose. Nach Einleitung der Apoptose kommt es in den Zellen zu

einer Aktivierung von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Endonukleasen. Diese schneiden die DNA in der Linkerregion in charakteristische Fragmente, deren Größe jeweils ein Vielfaches von 180 bp beträgt, sodass im Agarosegel ein charakteristisches Bandenmuster entsteht.

Für die DNA-Fragmentierung wurden 1×10^6 Zellen auf 6-Wellplatten ausplattiert und nach 24 h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Zum Ende der Schädigung wurden die Zellen ohne vorherigen Mediumwechsel vom Boden der Wells abgespült, sodass adhärente und schwimmende Zellen vereinigt wurden. Nach Pelletieren der Zellen (2 min, 5000 rpm) folgte ein Waschschrift mit 1x PBS (2 min, 12000 rpm). Die Zellpellets konnten zur späteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert werden. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet mit 500 μl Lysepuffer versetzt und vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 5 μl RNase A folgte eine Inkubation von 40 min bei 37°C unter leichtem Schütteln. Die Proteine wurden durch Zugabe von 125 μl NaCl, Mischen durch Invertieren und Inkubation für 60 min bei 4°C gefällt. Danach wurde für 15 min bei 12000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt (250 μl Chloroform + 500 μl Rotiphenol). Nach Mischen für 2 min und erneuter Zentrifugation (15 min, 12000 rpm, 4°C) wurde der Überstand erneut mit 650 μl Chloroform extrahiert und zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4°C). Die Fällung der DNA aus dem Überstand erfolgte dann in einem frischen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 1 ml vorgekühltem (-20°C) Isopropanol für eine Stunde bei -20°C oder über Nacht bei 4°C . Nach Zentrifugation (15 min, 12000 rpm, 4°C) wurden die Pellets für 10 min luftgetrocknet, in 30 μl TE-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Quantifizierung am Photometer erfolgte nach einer 1:100 Verdünnung in TE-Puffer.

Für die Auftrennung der Proben wurde ein 1,75 - 2 %-iges Agarosegel verwendet. 5 - 15 μg DNA wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt aufgetragen und bei verschiedenen Laufweiten wurde das Gel unter UV an einer Geldokumentationsanlage ausgewertet.

2.3.12 Nachweis von ROS ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$)

Der Nachweis der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen erfolgte fluorimetrisch über die Sonde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$). Hierbei handelt es sich um ein nicht fluoreszierendes Molekül, das lipophil ist und über die Zellmembran diffundieren kann. In den Zellen erfolgt durch Esterasen eine Abspaltung des Diacetats, sodass die Sonde in ihrer reduzierten, nicht-fluoreszenten Form vorliegt und nur noch schwer membrangängig ist. Durch in den Zellen vorhandene ROS kann das H_2DCF zu 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert und über eine Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden.

Die Entstehung von intrazellulären ROS wurden a) als Akkumulation während der Doxorubicin Inkubation und b) nach einer Bolusgabe von H_2O_2 gemessen.

- a) Zur Messung der akkumulierten ROS Menge während Dox Inkubation wurden 4×10^5 Zellen auf 12-Wells oder 1×10^6 Zellen auf 6-Wells geteilt. Nach 24 h wurden die Zellen mit Dox und 50 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ko-inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Medium durch farbloses Medium ersetzt und die Fluoreszenz über 30 min gemessen (Ex: 485 nm, Em: 525 nm).
- b) 24 - 48 h nach transienter Transfektion der Zellen (6-Wells) mit den Katalase Expressionskonstrukten wurden die Zellen mit 50 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ für 30 min in Zellkulturmedium inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Zellkulturmedium durch farbloses DMEM ersetzt. Durch eine Bolusgabe von 1 mM H_2O_2 wurde die Akkumulation der ROS in den MCF-7wt, kat und mkat Zellen über 1 h gemessen (Ex: 485 nm, Em: 525 nm).

2.3.13 Nukleinsäuren

2.3.13.1 RNA Isolation mit Trizol

Auf den zuvor mit PBS gewaschenen Zellrasen wurde 1 ml Trizol[®] gegeben und die Zelllyse wurde durch wiederholtes Pipettieren per Kanüle beschleunigt. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation konnte die RNA in der wässrigen Phase isoliert werden. Das Fällern der RNA erfolgte durch Isopropanol. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wurde die RNA für 10 Minuten bei 4°C und 10000 rpm gefällt. Nach Waschen mit 75 % EtOH und Trocknen wurde das Pellet in 50 µl H₂O-DEPC aufgenommen. Für 10 Minuten bei 55-60°C denaturieren, um die Sekundärstrukturen zu zerstören. Es folgte die photometrische Quantifizierung.

2.3.13.2 Konzentrationsbestimmung von DNA & RNA

Die DNA und RNA Quantifizierung erfolgte am Photometer. Die Proben wurden zuvor jeweils 1:100 verdünnt und mittels einer Quarzküvette bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Basen) und 280 nm (Absorptionsmaximum der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) gemessen.

Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgenden Angaben für $\lambda = 260$ nm:

- DNA: 1 OD = 50 µg/ml DNA
- RNA: 1 OD = 40 µg/ml RNA
- Oligonukleotid: 1 OD = 20 µg/ml Oligonukleotid

Durch Berechnung des Verhältnisses 260/280 nm konnte die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. Für reine DNA und RNA liegt dieses Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0.

2.3.13.3 „Reverse Transcription PCR“ (RT-PCR)

Bei der RT-PCR dient eine RNA als Ausgangsmatrix für die PCR. Daher wird zuerst die RNA mithilfe der Reversen Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben. Als Primer wurde hier ein Oligo-dT Primer verwendet, der an das 3'- polyadenylierte Ende der RNA bindet. Die Ansätze wurden für 1 h bei 42°C inkubiert, abschließend die Reverse Transkriptase für 5 Minuten bei 95°C hitzeinaktiviert. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet (Puffer & Enzyme von Promega):

	Stammlösungen	Endkonzentration	1x Ansatz
5x Puffer			5 µl
dNTPs	10 mM	0,4 mM	1 µl
Oligo dT	50 µM	2 µM	1 µl
Ribonuclease Inhibitor	40 U/µl	1,6 U/µl	1 µl
Reverse Transkriptase	200 U/µl	8 U/µl	1 µl
dH ₂ O DEPC			X µl
RNA	1 µg		Y µl
Summe			25 µl

2.3.13.4 „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)

Die PCR ist eine zyklische Reaktion, bei der sich für bestimmte DNA-Sequenzen multiple Kopien (Amplifikationen) erstellen lassen (Mullis und Faloona, 1987). Für die PCR wird das Enzym Taq-Polymerase verwendet, das aus *Thermophilus Aquaticus* gewonnen wird. Die Taq-Polymerase hat den Vorteil, dass sie fast ohne Funktionsverlust Denaturierungsphasen bei 90-95°C übersteht. Für die RT-PCR wurde die GoTaq[®] Polymerase von Promega verwendet.

Eine PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen: Im ersten Schritt wird die DNA Matrize bei 95°C denaturiert, sodass beide komplementären Stränge als Template vorliegen. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, erfolgt die Hybridisierung der 2 spezifischen Primer an ihrer komplementären Sequenz der DNA. Im dritten Schritt,

der Elongation, werden die Transkripte in 5' - 3' Richtung ausgehend von den hybridisierten Primern durch die Taq-Polymerase verlängert. Die Elongation erfolgt bei 72°C, hier besitzt die Taq-Polymerase ihr Temperaturoptimum. Das Prinzip der PCR ist die nun folgende zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Ab der zweiten Wiederholung entstehen DNA-Stränge definierter Größe, deren Anzahl sich bei jedem weiteren Reaktionsdurchlauf verdoppelt. Es kommt zu einem exponentiellen Wachstum der Anzahl dieser DNA-Stränge. Abschließend erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72°C, um sicher zu stellen, dass die Polymerase alle noch offenen Transkripte beenden konnte.

Die *Annealing*-Temperatur der Primer wurde für alle Primer Paare zwischen 50°C und 65°C gewählt. Sie ist abhängig von der Länge der Primer (20 Basenpaare) und dem GC-Gehalt (50 % GC-Gehalt). Nach folgender Faustformel lassen sich die T_m-Werte von Primern abschätzen:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times (\text{G+C}) + 2 \times (\text{A+T})$$

Anhand des Schätzwertes wurde die *Annealing*-Temperatur so gewählt, dass bei der Reaktion das spezifische Amplifikat erwarteter Größe entstand. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet: (Puffer & Enzyme von Promega)

	Stammlösungen	Endkonzentration	1x Ansatz
5x Puffer			5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	10 µM	0,4 µM	1 µl
Primer 1	10 µM	0,4 µM	1 µl
Primer 2	10 µM	0,4 µM	1 µl
Template		y	1,5 µl
Taq	5 U/µl	1 U/25 µl	0,25 µl
H ₂ O			13,25 µl
Summe			25 µl

2.3.13.5 Quantitative Realtime PCR

Realtime PCR Reaktionen wurden mit dem GeneAmp 7300 PCR-Gerät (AB Applied Biosystems) durchgeführt. Bei der *Realtime* PCR kann man mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green in „Echtzeit“ bei jedem Temperaturzyklus der PCR den Anstieg der Produktmenge detektieren, da das SYBR Green mit doppelsträngigen Nukleinsäuren einen Komplex bildet, der charakteristisch fluoresziert. Durch die Aufnahme einer Schmelzkurve am Ende der Reaktion ist überprüfbar, wie viele Produkte entstanden sind. Die Verwendung des „*SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix*“ (SIGMA) und der „*Quantitect Primer Assays*“ (Qiagen) für Katalase und GAPDH (interner Standard) erfolgte nach den Angaben der Hersteller in 96-Multiwellplatten in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Als Template wurden 10 ng cDNA eingesetzt, die in die 96-Multiwellplatten vorgelegt wurden. Als Letztes erfolgte die Zugabe des Mastermixes. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

	Stammlösungen	Endkonzentration	1x Ansatz
<i>SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix</i>	2x	1x	10 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2 µl
<i>Internal Reference Dye</i>	100x	1x	0,2 µl
<i>Quantitect Primer Assay</i>	10x	1x	2 µl
cDNA	2,5 ng/µl	10 ng/20µl	4 µl
H ₂ O			1,8 µl
Summe			20 µl

Verwendetes Temperaturprogramm:

Temperatur	Zeit	
50°C	2 min	
95°C	15 min	
94°C	15 sek	(40x)
55°C	30 sek	
72°C	30 sek	
95°C	15 sek	Schmelzkurve
60°C	30 sek	

Die Auswertung und statistische Analyse der *Realtime* PCR erfolgte mit Hilfe des „*Relative Expression Software Tool*“ (REST©) (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002, 2004).

2.3.13.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA & RNA

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren mithilfe einer Agarose Matrix nach ihrer Größe „gesiebt“. Für doppelsträngige und nach Denaturierung als „*random coil*“ vorliegende einzelsträngige Nukleinsäuren bestimmter Länge ergibt sich so ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus ihres Molekulargewichts und ihrer Laufweite im Gel. Zu große oder kleine Fragmente sind hierbei ausgenommen, da sie entweder zu sehr gestaucht werden oder zu klein für den Siebeffekt des Geles sind (Southern, 1979).

2.3.13.6.1 Agarosegele

Für alle DNA Elektrophoresen wurden Agarosegele verwendet. Agarose besteht aus einem Heteroglucan aus β -D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose in alternierender α -1,3/ β -1,4-Verknüpfung. Agarosegele eignen sich zur Trennung von ca. 0,1 - 60 kb. Als Puffer wurde 1x TBE Puffer verwendet. 100-200 ml Puffer wurden mit 0,8 - 4 g Agarose versetzt und aufgekocht. Das TBE/Agarose Gemisch wurde unter Rühren bis auf Handwärme abgekühlt, mit EtBr (interkaliert zwischen die „*gestackten*“ Basen) versetzt und in eine Kammer gegossen. Nach Festwerden des Geles wurde mit 1x TBE überschichtet und die Proben, die zuvor mit DNA-Auftragspuffer oder 10x GoTaq-Polymerase Puffer versetzt wurden, in den Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 50 - 170 mA durchgeführt, bis die untere Blaumarkerfront $\frac{3}{4}$ der Trennstrecke durchlaufen hatte. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV an einer Geldokumentationsanlage.

2.3.13.6.2 Denaturierende Gele zur Auftrennung von RNA

Die RNA Proben wurden in denaturierenden MOPS/Agarosegelen aufgetrennt. Um eine „*random coil*“ Struktur der RNAs zu erhalten, können diese mit Formaldehyd unter Aufhebung der Wasserstoffbrücken irreversibel denaturiert werden.

Für das RNA-Gel wurden 10 ml 10x MOPS-Puffer, 73,8 ml dH₂O und 1,5 g Agarose aufgekocht und unter Rühren auf ca. 60°C abgekühlt. Es wurden 16,2 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel sofort gegossen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die RNA Proben wurden mit 2-3 Volumen RNA Auftragspuffer versetzt, der EtBr enthielt, 5 min bei 60°C denaturiert und sofort aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V.

2.3.13.7 Isolation von DNA aus Agarosegelen über Gelelution

Die Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen erfolgte nach dem „*Qiaquick Gel Extraction Kit*“ (Qiagen) oder „*Wizard® SV Gel and PCR cleanup System*“ (Promega) nach den Angaben der Hersteller. Nach der Säulenelution wurde die DNA im

Agarosegel quantifiziert. Dazu wurde 1/10 Volumen des Eluats aufgetragen und die DNA Menge mithilfe eines Größenstandards bestimmt.

2.3.13.8 Enzymatische Reaktionen an DNA

1) Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II

Für Restriktionsenzyme gilt, dass in der Regel 1 Unit Enzym bei optimalen Bedingungen von 37°C 1 µg DNA in 1 h restringiert. Die Durchführung der Restriktionsanalysen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fermentas) und das Ergebnis wurde in einem Agarosegel überprüft.

2) Dephosphorylierung von 5'-Enden

Für Klonierungsreaktionen ist es notwendig, die 5'-terminalen Enden restringierter Plasmide durch eine alkalische Phosphatase zu dephosphorylieren, um eine Re-Ligation dieser DNA zu verhindern. Dazu wurde nach Ende der Restriktionsreaktion 1 µl alkalische Phosphatase zu den Restriktionsansätzen gegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Eine Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde durch Inkubation von 10 min bei 65°C erzielt.

2.3.14 Bakterien

2.3.14.1 Ligation von DNA

Bei einer Ligation werden 2 lineare DNA Fragmente über eine Phosphodiesterbindung, die von dem Enzym T4-Ligase katalysiert wird, miteinander verbunden. In der Regel wird die Ligation verwendet, um ein definiertes DNA Fragment in einen Vektor zu ligieren. Man unterscheidet die Ligation von „*sticky end*“ oder „*blunt end*“ Fragmenten. Die „*sticky end*“ Ligation ist einfacher, da 2 Moleküle mit komplementären Enden ligiert werden. Bei einer „*blunt end*“ Ligation müssen die glatten Enden ligiert werden. Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers über Nacht bei RT oder 4°C in der Regel im Verhältnis Vektor zu Insert von 1:3 oder 1:5 durchgeführt.

2.3.14.2 Transformation

Für die Transformation wurden 50 - 100 µl kompetente Zellen (DH5α) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA wurden Zellen für weitere 10 – 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 45 sek bei 42°C. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer Volumenreduktion (5 min. 2000xg) wurden die Zellen auf LB-Amp oder LB-Kana Platten ausplattiert. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden zuvor auf den Platten zusätzlich 20 µg/ml x-Gal und 200 µM IPTG ausplattiert.

2.3.14.3 Isolation von Plasmid DNA

2.3.14.3.1 Mini-Präparation (Chowdhury, 1991)

3 ml über Nacht Kultur wurden 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. 0,5 ml Überstand wurde auf dem Zellpellet belassen und 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur Zellextraktion zugegeben. Nach 5 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde die durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol freigesetzte DNA mittels Isopropanol aus der wässrigen Phase bei 4°C (5 min, 10000 rpm) gefällt. Nach Waschen des Pellet mit EtOH und Trocknen wurde dieses in 50 µl dH₂O aufgenommen und für 30 min bei RT mit 1 µl RNase A inkubiert.

2.3.14.3.2 Alkalische Lyse (nach Birnboim und Doly, 1979)

Bei der alkalischen Lyse wird eine schnelle Abfolge von De- und Renaturierung genutzt, um die kleinere Plasmid DNA von der bakteriellen DNA zu trennen. Nach der Denaturierung fällt die bakterielle DNA als Netzwerk aus. Die Plasmid DNA dagegen kann aufgrund der geringeren Größe renaturieren und verbleibt im Überstand. 3 ml Kultur wurden abzentrifugiert, das erhaltene Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung (osmotischer Schock) resuspendiert und für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl RNase für 20 - 25 Minuten bei Raumtemperatur wurden 200 µl NaOH/SDS – Lösung zur Neutralisierung zugegeben. Nach 5 min wurden 150 µl Kalium-Acetat-Lösung hinzugefügt und nach kurzem Mischen, für weitere 5 min auf Eis inkubiert, um die Denaturierung zu stoppen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vom entstandenen Pellet abgenommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA mit kaltem 95%-igem EtOH gefällt. Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 30 µl dH₂O oder in TE-Puffer aufgenommen.

2.3.14.3.3 Plasmid Präparation (Mini, Midi & Maxi Kits, Qiagen)

Die durchgeführten Mini-, Midi- und Maxi-Plasmid Präparationen erfolgten nach Angaben des Herstellers. Durch Verwendung dieser Säulen-Kits konnte sehr reine DNA gewonnen werden.

2.3.14.4 Glycerin Stocks

Zur längeren Konservierung von Bakterienklonen wurden Glycerin Stocks hergestellt. Dazu wurden 1,5 ml Bakterienkultur zu 1 ml Glycerinlösung gegeben sofort auf Eis gestellt und in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Mithilfe einer Impföse konnte aus dem eingefrorenen Glycerin Stock eine frische Kultur angeimpft werden.

2.3.15 Proteine

2.3.15.1 Isolation von Proteinen

2.3.15.1.1 Gesamtprotein Lysate

Für die Proteinisolation wurde als Lysepuffer RIPA-Puffer verwendet. Der Puffer wurde zusätzlich mit den Proteaseinhibitoren Aprotinin & Leupeptin (oder einem Protease Inhibitorcocktail) und PMSF versetzt. Der Zellrasen wurde mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin konnten die Zellen ebenfalls mit 1x PBS oder mit dem Mediumüberstand abgelöst werden. Es wurde 2x für 2 min bei 5000xg zentrifugiert, wobei im zweiten Schritt noch einmal mit PBS gewaschen wurde. Danach wurden die Pellets in RIPA-Puffer (+Protease Inhibitoren) aufgenommen, gemischt und bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen und erneutem Einfrieren wurde für 10 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Für die im Überstand enthaltenen Proteine wurde nach einer 1:5 Verdünnung eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.3.15.1.2 Zytosolische & Nukleäre Fraktionen

Für die zelluläre Fraktionierung in Zytosolfraktion und Kernfraktion wurden sowohl die adhärenenten als auch die bereits abgelösten Zellen vereint. Dazu wurden die Zellen entweder nach vorheriger Trypsinisierung oder direkt mit dem Mediumüberstand von den Zellkulturplatten abgespült und 2x mit 1x PBS gewaschen (2 min, 5000 x g). Die erhaltenen Pellets wurden in 100-200 µl Puffer A resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Zellsuspension 4x durch eine 25G Kanüle gezogen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1/8 Volumen 10 % [v/v] NP-40 versetzt und kurz kräftig gevortext. Nach Zentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4°C) konnte die Zytosolfraktion abgenommen und bei -80°C gelagert werden. Das Pellet wurde mit 75-100 µl Puffer B versetzt und 30 min bei 4°C mit

einem Metallrührer lysiert. Die nach Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) erhaltene Kernfraktion wurde ebenfalls bei -80°C gelagert. Nach einer 1:5 oder 1:10 Verdünnung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.3.15.1.3 Mitochondriale Proteine

Zur Isolation von mitochondrialen Fraktionen wurde das „*Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells*“ von PIERCE ohne Homogenisierung nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proben wurden bei -80°C gelagert und die Proteinkonzentrationen nach einer 1:5 Verdünnung bestimmt.

2.3.15.2 Proteinbestimmung

2.3.15.2.1 Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem „*BIO-RAD DC Protein Assay*“ von BIO RAD Laboratories nach Angaben des Herstellers in 96-Wellplatten. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet.

2.3.15.2.2 Bradford

Für die Bradford Proteinbestimmung wurde ein für 96-Wellplatten modifiziertes Assay nach Angaben des Herstellers (BioRAD Laboratories) durchgeführt. Als Proteinstandard diente BSA.

2.3.15.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die Gelelektrophorese der Proteine erfolgte in Polyacrylamidgelen mit Sammel- und Trenngel. Hierzu wurde eine Lösung aus Acrylamid und Bisacrylamid durch APS zur radikalischen Polymerisation angeregt, wobei das Acrylamid zu langen Ketten reagiert, die durch das bifunktionelle Bisacrylamid vernetzt werden. Je nach Prozentigkeit des Trenngels (10 % (größere Fragmente) -15 % (kleinere Fragmente)) konnten unterschiedliche kDa Bereiche schärfer aufgetrennt werden.

Zusammensetzung der Gele: (Ansatz für Mini-Gele, doppelter Ansatz für großes Gel)

	Trenngel [10 %]	Trenngel [12 %]	Trenngel [15 %]	Sammelgel [4,5 %]
Acrylamid-Bisacrylamidlösung 30 %	2 ml	2,4 ml	3 ml	0,608 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	2 ml
dH ₂ O	2,5 ml	2,1 ml	1,5 ml	1,380 ml
APS 10 % [w/v]	30 µl	30 µl	30 µl	24 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	4 µl

Die Polymerisation des Trenngels erfolgte zwischen 2 Glasplatten für 1 h, wobei das Gel mit Butanol überschichtet wurde. Nach Abgießen des Butanols wurde das Sammelgel (4,5 %) gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingeführt, die Polymerisation dauerte 30 min.

Proteine unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Aminosäure-Zusammensetzung in ihrer Ladung. Eine Auftrennung nach Größe kann daher nur in denaturierter Form erfolgen. Die Proteinproben wurden auf 5 - 80 µg Protein eingestellt und mit ¼ Volumen SDS Auftragspuffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 95°C wurden die Proben sofort auf Eis überführt. Das im Auftragspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol sorgt für eine Auflösung der Disulfidbrücken. Das SDS verursacht zusätzlich durch Anlagerung an den Proteinen ein Auflösen der Struktur. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen des SDS eine gleichmäßig verteilte negative Ladung, sodass die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur noch von der relativen Molekülmasse

abhängig ist. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer für 30 Minuten bei 15 - 30 mA, bis das Trenngel erreicht ist und für weitere 90 - 120 Minuten bei 150 V.

2.3.15.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Der Proteintransfer erfolgte als „*semi-dry*“ Blot in einer Blottingapparatur. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgt von Kathode zu Anode in einem *Sandwich* aus Whatmannpapieren. Für den Aufbau des Blotts wurden jeweils 4 Whatmannpapiere in Anoden- und Kathodenpuffer getränkt und das Trenngel und die PVDF-Membran auf die gewünschte Größe zugeschnitten. Die Membran wurde für einige Sekunden in Methanol geschwenkt und, um ein Austrocknen zu verhindern, in Wasser gehalten. Je nach Ausrichtung der Blotting Apparatur wurden zuerst 4 in Anoden- oder Kathodenpuffer getränkte Whatmannpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Die Reihenfolge von PVDF-Membran und Gel erfolgte so, dass die Membran immer Kontakt zu den in Anodenpuffer getränkten Papieren hatte. Als Letztes wurden die restlichen 4 Whatmannpapiere aufgelegt. Der Blot wurde bei 270 mA und 30 W für 30 min durchgeführt.

2.3.15.5 Färbung filtergebundener Proteine

2.3.15.5.1 Coomassie

Coomassie Brilliant Blue ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der in saurem Medium durch elektrostatische Wechselwirkungen an freie geladene Amino- und Iminogruppen binden kann. Proteine auf Membranen lassen sich so durch Coomassie Brilliant Blue sichtbar machen. Dazu wurde die Membran kurz in Coomassie Färbelösung geschwenkt, bis sich eine einheitlich blaue Färbung zeigte. Durch darauffolgendes Schwenken in Coomassie-Entfärbelösung konnten die Proteinbanden gegenüber dem Hintergrund sichtbar gemacht werden.

2.3.15.5.2 Ponceau-S

Die Ponceau-S Färbung, bei der das Ponceau an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet, ist reversibel. Daher wurde sie in erster Linie dazu verwendet direkt nach dem Blotten den Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen zu überprüfen. Dazu wurde die Membran direkt nach dem Blotten in dH₂O überführt, um ein Austrocknen zu verhindern und dann kurz in Ponceau-S Lösung geschwenkt (wiederverwendbar). Die Entfärbung der Membran erfolgte in dH₂O, bis sich die Proteine gut erkennen ließen.

2.3.15.6 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine

Die PVDF-Membran wurde zur Blockierung in 5 % Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Primär-Antikörperinkubation erfolgte ebenfalls in 5%-iger Blockierlösung oder spezifischer 1.Antikörperlösung über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei Raumtemperatur. Nach Ende der 1.Antikörperinkubation wurde die Membran 4 - 6x 10 min in TBST unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper erfolgte in 5 %-iger Blockierlösung für 1 h bei RT. Danach wurde erneut für 4 - 6x 10 min in TBST unter leichtem Schütteln gewaschen.

2.3.15.7 Chemilumineszenz Detektion

Die Chemilumineszenz Detektion erfolgte mittels des „*BM Chemiluminescence Blotting Substrate* (POD)“ von Roche oder dem „*Super Signaling Kit*“ von PIERCE. Durch Verwendung der HRP-gekoppelten 2.Antikörper konnte in Anwesenheit von

H₂O₂ das Substrat Luminol zu einem Licht emittierenden Intermediat oxidiert werden. Die Detektion der Lichtsignale erfolgte durch Auflegen von Röntgenfilmen für unterschiedliche Zeiträume. Die exponierten Filme wurden für ca. 10 sek in Entwickler geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und für ca. 3 min in Fixierer inkubiert. Nach Ende des Fixierens wurden die Filme für wenige min gewässert.

2.3.15.8 Strippen von PVDF- Membranen

Um auf einer bereits verwendeten Membran noch ein weiteres Protein immunologisch zu detektieren, wurden die PVDF-Membranen „gestrippt“. Dazu wurde die Membran entweder direkt nach der Chemilumineszenz Detektion für 10 min in TBST gewaschen oder bereits getrocknete Membranen wurden für 10 sek in Methanol geschwenkt und dann 10 min in TBST gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C in Stripping Buffer (PIERCE) (zuvor auf 37°C erwärmt) unter leichtem Schütteln. Am Ende der Reaktion wurde die Membran für 10 min in TBST gewaschen und dann erneut für 1 h oder über Nacht blockiert und mit den gewünschten Antikörpern umgesetzt.

2.3.15.9 *In vitro* Transkription/Translation

Die *in vitro* Transkription/Translation erfolgte mit dem „*TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System*“ von Promega. Das Retikulozyten-Lysat diente in diesem System als eukaryotisches Translationssystem. Durch Zugabe von Transcend t-RNA, dabei handelt es sich um ε-markierte biotinylierte Lysin t-RNA Komplexe, wurden während der Translation biotinylierte Lysine in die Proteine eingebaut. Unter Verwendung des „Transcend Non-Radioactive Translation Detection System“ von Promega konnte die spezifische Bindung des Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörpers über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen werden.

Nach Ende der *in vitro* Transkription/Translation wurden 5 µl der Reaktion auf ein Proteingel aufgetragen. Die im Trenngel enthaltenen Proteine wurden für 1 h „semi-dry“ auf eine PVDF Membran geblottet. Die Membran wurde danach 1 h in TBST Puffer geschüttelt. Darauf folgte 1 h Inkubation mit dem Streptavidin-HRP Antikörper in Blockierlösung. Abschließend wurde die Membran 3x 5 min in TBST und 3x 5 min in H₂O unter Schütteln gewaschen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde erneut wie unter 2.3.15.7 über Röntgenfilme detektiert.

2.3.15.10 Messung der Katalase Enzymaktivität

Das antioxidative Enzym Katalase katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Die Messung der Katalase Aktivität erfolgte mithilfe eines Photometers bei 240 nm indirekt über den Abbau von Wasserstoffperoxid (modifiziert nach Clairbone *et al.*, 1979). Für die Enzymmessung wurden die Proben in einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen, 15 sek auf Eis sonifiziert und 10 min bei 13000 und 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde nach einer 1:5 Verdünnung ermittelt und die Proben auf eine Konzentration von 150 - 600 mg/ml eingestellt.

	Endkonzentration	Probengemisch	
Proteine	150 -600 mg/ml	X µl	
Phosphatpuffer	50 mM	Y µl	
EtOH	0,17 M	3 µl	30 min Eis
Triton X 100	1 %	30 µl	10 min Eis
Summe		300 µl	

Für die Messung wurden 920 µl Reaktionspuffer (19 mM H₂O₂ in Phosphatpuffer pH 7,0) und 80 µl des Probengemisches in eine Quarzküvette pipettiert und die

Extinktionsänderung über 1 min gemessen. Die Aktivität der Katalase (Units/mg Protein) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Units/mg} = \frac{\Delta A_{240\text{nm}} \times 1000}{43,6 \times \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml Reaktionsmix}}}$$

(molarer Extinktionskoeffizient von H₂O₂: 43,6)

2.3.16 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte ± Stbw oder SEM von mindestens 3 unabhängigen Ergebnissen angegeben. Für die Analyse der statistischen Signifikanz wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als *Posthoc*-Test wurde ein LSD Test (*least significant difference*) durchgeführt (Statistica). Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Abschnitt wurde der Einfluss der Katalase Überexpression auf die Sensitivität der MCF-7 Mamma-Karzinomzellen gegenüber dem Zytokin TNF- α und der Hct-116 Kolon-Karzinomzellen gegenüber dem Zytostatikum Doxorubicin untersucht. Im zweiten Abschnitt erfolgte die Charakterisierung der Doxorubicin Wirkung auf die Kolon-Karzinomzellen. Dabei wurde die Rolle des PI3K/AKT Signalweges und des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors FOXO4 bei der Doxorubicin vermittelten Sensitivität untersucht.

3.1 Modulation des endogenen Redox-Status

Unter physiologischen Bedingungen liegt intrazellulär ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen vor. Gerät diese Redox-Homöostase, meist durch exogene Stimuli, aus dem Gleichgewicht, entsteht in den Zellen oxidativer Stress. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des oxidativen Stresses für die TNF- α und Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität in Krebszellen untersucht. TNF- α vermittelt seine Wirkung über membranständige Rezeptoren. Ein Mechanismus der TNF- α induzierten Zytotoxizität ist die Induktion von oxidativem Stress in den Zellen. Doxorubicin dagegen wirkt intrazellulär auf die DNA und kann als Redox-Zyklus ebenfalls oxidativen Stress induzieren. Die Bedeutung des oxidativen Stresses für die durch TNF- α und Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität wurde über einen Vergleich zwischen wildtypischen Zellen und solchen, die das antioxidative Enzym Katalase überexprimieren, untersucht. Durch die Überexpression der Katalase sollte in den Zellen die Redox-Homöostase in Richtung der antioxidativen Kapazität verschoben und die Zellen stärker gegen oxidativen Stress geschützt werden.

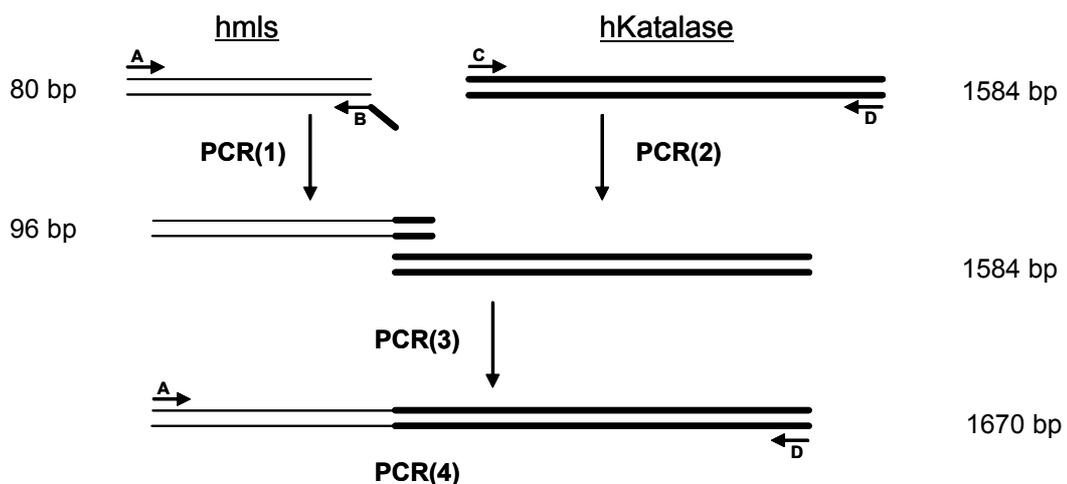
3.1.1 Katalase und TNF- α in MCF-7 Zellen

Die Versuche mit dem pleiotropen Zytokin TNF- α wurden an humanen Mamma-Karzinom Zellen (MCF-7) durchgeführt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um epitheliale Zellen, die sensitiv auf einen Stimulus mit exogenem TNF- α reagieren (Sivaprasad und Basu, 2008). Als Nebenprodukte des aeroben Metabolismus und durch exogene Stimuli entstehen in den Mitochondrien Superoxidradikalanionen. Diese werden durch die mitochondrial lokalisierte MnSOD zu H₂O₂ und Sauerstoff

disproportioniert. Der Abbau des H_2O_2 wiederum erfolgt über die in den Peroxisomen lokalisierte Katalase. Um Einfluss auf den intrazellulären H_2O_2 Gehalt zu nehmen, wurde für die folgenden Versuche in den MCF-7 Zellen das antioxidative Enzym Katalase überexprimiert. Es wurden zwei Katalase Expressionskonstrukte verwendet. Einerseits wurde die Katalase durch transiente Transfektion der Katalase cDNA in den Peroxisomen, ihrem physiologischen Lokalisationsort, überexprimiert (MCF-7kat) (Lüpertz *et al.*, 2008). Zum anderen wurde die Katalase cDNA am N-Terminus mit der mitochondrialen Leadersequenz (MLS) der MnSOD gekoppelt, um einen Transport der Katalase in die Mitochondrien zu erreichen (MCF-7mkat). Durch die Lokalisation der Katalase in den Mitochondrien wurde die Katalase parallel zur MnSOD und somit am Entstehungsort des H_2O_2 in den Zellen überexprimiert.

3.1.1.1 hmlsKatalase Klonierung

Die MLS ist eine Sequenz, die Proteinen wie der MnSOD vorgeschaltet ist und den Transport der fertig synthetisierten Proteine in die Mitochondrien steuert.



Primer:

A: 5'-hmls-Primer; 18 nts der hmls
+ 5'XbaI Schnittstelle

C: 5'-hmls-Primer; 18 nts der hKatalase

B: 16 nts 3' der hmls + 16 nts der Katalase
(Überhang ist komplementär zu PrimerC)

D: 3'-Primer; 18 nts der hKatalase

Abb.1: Fusionsklonierung von hmls und Katalase.

Klonierungsstrategie zur Fusion von hmls und Katalase in einer RT-PCR Reaktion. **PCR(1) & (2):** Individuelle PCRs für die hmls und die Katalase mit den 5'-Aussenprimern (A/C) und den 3'-Aussenprimern (B/D) (PCR Bedingungen: Katalase & hmls: 1' 95°C, 1' 52°C, 2' 72°C, 30 Zyklen). Durch Verwendung des Hybridprimers (B) in **PCR(1)** entsteht ein hmls Fragment mit einem 16 nt Überhang komplementär zur Katalase. **PCR(3):** Nach Gelelution, PCR für 5 Zyklen mit den beiden Produkten, aber ohne Zugabe von Primern (PCR Bedingungen: Fusions-PCR: 1' 95°C, 1' 52°C, 2' 72°C, 5 Zyklen). **PCR(4):** Zugabe des 5'-hmls und des 3'-hKatalase Primers zu der PCR(3) Reaktion und PCR für weitere 30 Zyklen, um das Fusionsprodukt zu amplifizieren.

Die mitochondriale Leadersequenz und die Katalase cDNA wurden mithilfe einer PCR fusioniert. Abbildung 1 zeigt schematisch das Prinzip der Fusions-PCR. Das hmlsKatalase Fusionsprodukt besaß die erwartete Größe von 1670 bp, welche im

Agarosegel durch direkten Vergleich zur humanen Katalase (1584 bp) verifiziert werden konnte (Abb.2A). Für die transiente Transfektion wurde die cDNA in den

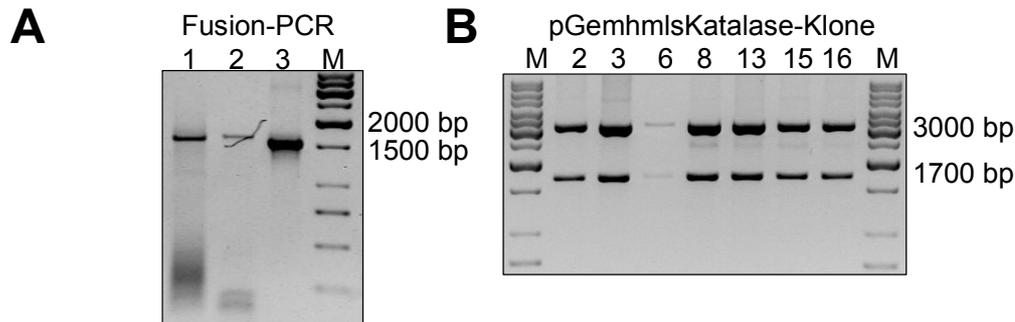


Abb.2: Fusionsklonierung von hmls und hKatalase.

(A) Ergebnis der Fusions-PCR: 1 = hmlsKatalase Produkt 1, 2 = hmlsKatalase Produkt 2, 3 = hKatalase; (B) Restriktion der pGemhmlsKatalase2-16 Klone mit *XbaI* und *PstI*.

eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo umkloniert. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Das durch einen Restriktionsverdau mit *XbaI* und *PstI* erhaltene ca. 1700 bp große Fragment (Abb.2B) wurde gerichtet in den Expressionsvektor ligiert.

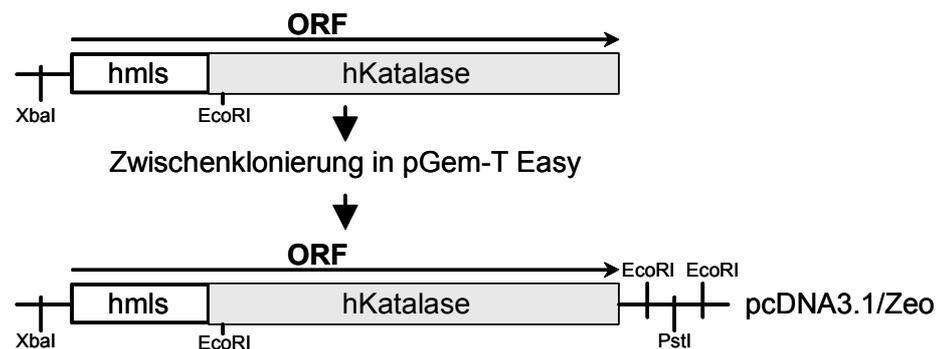


Abb.3: Klonierungsstrategie.

Für die gerichtete Klonierung des hmlsKatalase Fusionskonstruktes in den pcDNA3.1/Zeo Expressionsvektor wurde über eine Fusions PCR (Abb.2) das cDNA Produkt amplifiziert und zusätzlich am 5'-Ende eine *XbaI* Schnittstelle eingefügt. Das PCR Produkt wurde in den pGem-T Easy Zwischenvektor ligiert. Die gerichtete Umklonierung in den pcDNA3.1/Zeo Expressionsvektor erfolgte über die 5'-*XbaI* und eine 3'-*PstI* Schnittstelle aus der MCS des pGem-T Easy Vektors. Die Testrestriktion der pZeohmlsKatalase Klone erfolgte mit *EcoRI*.

Die erhaltenen pZeohmlsKatalase Klone wurden mithilfe einer *EcoRI* Restriktionsanalyse überprüft. Die Restriktionsanalyse mit *EcoRI* führte zu den erwarteten 3 Fragmenten mit jeweils ca. 5255, 1392 bp & 19 bp. In Abbildung 4A sind die beiden höher molekularen Fragmente zu erkennen. Die Expression des hmlsKatalase Fusionsproteins wurde zusätzlich mithilfe einer *in vitro* Transkription/Translation getestet. Der nach der Reaktion durchgeführte Katalase

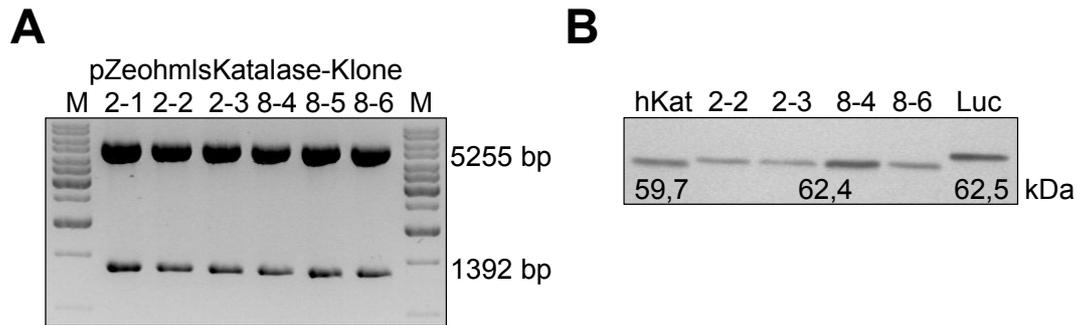


Abb.4: hmlsKatalase Expressionsvektoren.

(A) Testrestriktion der pZeohmlsKatalase Klone mit *EcoRI*. (B) Ergebnis des Western Blots nach der *in vitro* Transkription/Translation. hKat = Protein exprimiert vom pZeohKat Vektor; 2-2, 2-3, 8-4, 8-6 = pZeohmlsKatalase Klone; Luc = Luziferase Positiv Kontrolle.

Western Blot (Abb.4B) zeigte, dass bei den pZeohmlsKatalase Klonen ein Produkt mit erwarteter Größe von 62,4 kDa entstand. Im Vergleich zur Katalase waren die hmlsKatalase Proteine um 1,7 kDa, also die MLS, größer. Die *in vitro* Transkription/Translation der Luziferase (62,5 kDa) wurde als Positivkontrolle verwendet (Abb.4B). Da der Klon pZeohmlsKatalase8-4 die stärkste Proteinexpression besaß, wurde dieser Vektor für die weiteren Versuche verwendet.

3.1.1.2 Charakterisierung der Katalase Expression

Um die Expression der Katalase in den MCF-7 Zellen zu charakterisieren, wurden die Zellen mit den beiden Katalase cDNAs transfiziert. 24 - 48 h nach der transienten Transfektion wurde die Expression der Katalase in den MCF-7 Zellen untersucht.

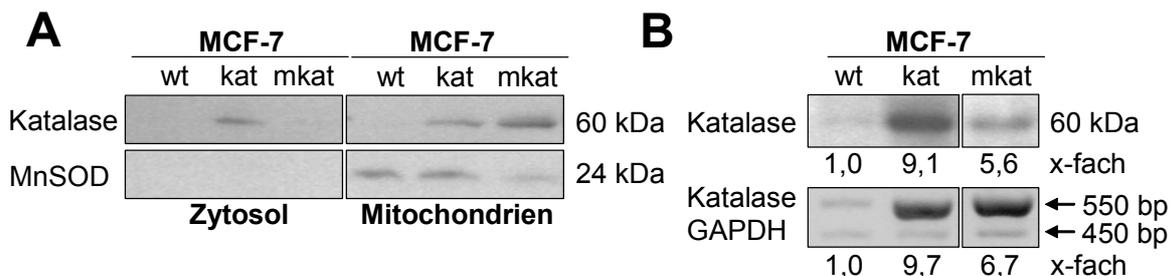


Abb.5A+B: Katalase Überexpression und Lokalisation in MCF-7 Zellen.

24 - 48 h nach der transienten Transfektion wurde die Expression der Katalase in MCF-7wt und MCF-7kat Zellen untersucht. (A) Expression der Katalase und MnSOD in Zytosol und Mitochondrien nach Fraktionierung und Western Blot. (B) Nachweis der Katalase Expression mittels RT-PCR und Western Blot (n=3; PCR-Bedingungen: Katalase: 1' 95°C, 1' 54°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen).

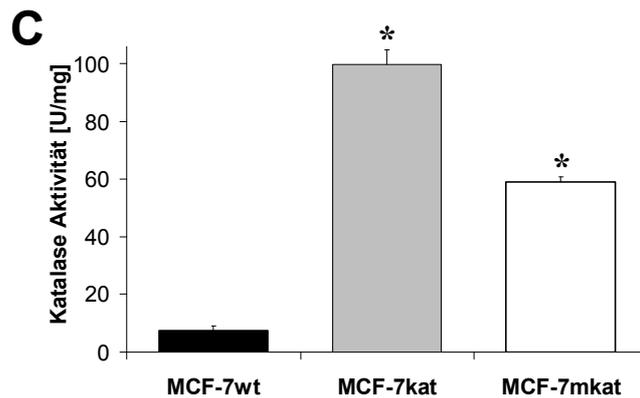


Abb.5C: Katalase Überexpression und Lokalisation in MCF-7 Zellen.

24 - 48 h nach der transienten Transfektion wurde die Expression der Katalase in MCF-7wt und MCF-7kat Zellen untersucht. Photometrische Bestimmung der Katalase Aktivität (n=3, $x \pm SD$, * $p < 0,05$ bezogen auf die MCF-7wt Zellen, ANOVA).

Eine Fraktionierung der transfizierten Zellen in zytosolische und mitochondriale Fraktion (Abb.5A) zeigte, dass die MCF-7kat Zellen eine deutliche Expression der Katalase im Zytosol besaßen. Allerdings war auch ein Teil der Katalase Expression in den Mitochondrien nachzuweisen. Die MCF-7mkat Zellen besaßen dagegen wie erwartet eine deutliche Katalase Expression in den Mitochondrien. Als Kontrolle für die saubere Trennung in zytosolische und nukleäre Fraktion wurde der MnSOD Western durchgeführt. Die MnSOD war erwartungsgemäß nur in der mitochondrialen Fraktion detektierbar (Abb.5A). Die Stärke der Katalase Expression in den MCF-7 Zellen wurde auf mRNA und Protein Ebene ermittelt. Zusätzlich wurde die Katalase Aktivität in den MCF-7 Zellen bestimmt. Auf mRNA Ebene zeigte sich eine 10-fache Überexpression der zytosolischen Katalase im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen. Die Expression der Katalase in den Mitochondrien war 7-fach stärker im Vergleich zu den Wildtyp Zellen (Abb.5B). Auf Proteinebene ergab sich ein ähnliches Bild. Auch hier war die Katalase ohne die mitochondriale Leadersequenz etwa 9-fach stärker exprimiert als in den MCF-7wt Zellen. Die mitochondrial lokalisierte Katalase zeigte eine 6-fach stärkere Expression (Abb. 5B). Die Aktivitätsmessung der Katalase unterstützte diese Ergebnisse zusätzlich. Hier konnte eine 10,5-fache signifikante Induktion der Katalase Aktivität im Vergleich zur basalen Aktivität und eine 6-fach signifikant höhere Aktivität der Katalase in den MCF-7mkat Zellen gemessen werden (Abb.5C). Die subzelluläre Verteilung der Katalase in den MCF-7kat Zellen im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen wurde zusätzlich über eine Immunfärbung verdeutlicht (Abb.6). Die MCF-7wt Zellen besaßen eine punktuelle Verteilung der Katalase im Zytosol, welche durch die Überexpression in den MCF-7kat Zellen deutlich erhöht wurde.

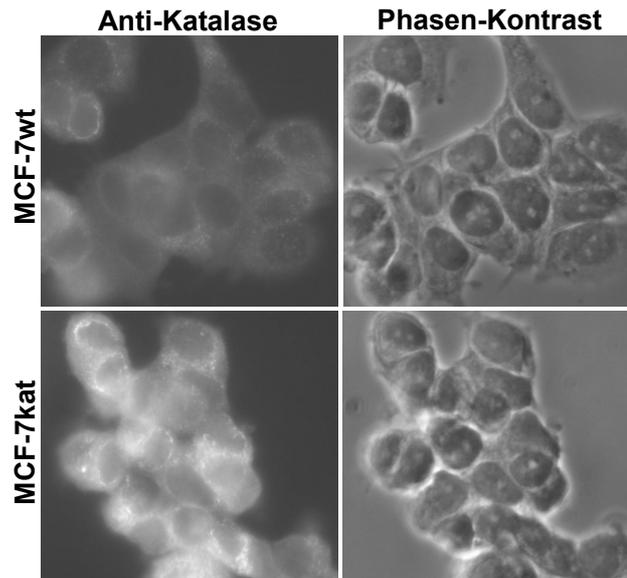


Abb.6: Katalase Überexpression und Lokalisation in MCF-7 Zellen.

Nachweis der Katalase Expression mittels Immunfluoreszenz. 24 - 48 h nach der transienten Transfektion wurden die MCF-7wt und MCF-7kat Zellen fixiert, permeabilisiert und blockiert. Nach der Inkubation mit primärem Katalase Antikörper (1:50) erfolgte eine Inkubation mit Rhodamin-gekoppeltem sekundär Antikörper (1:200). Die Lokalisation und Expression der Katalase wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Um die Funktionalität der Katalase *in vitro* im Zellsystem nachzuweisen, wurde ein Zytotoxizitätsassay mit H_2O_2 durchgeführt. Die Katalase katalysiert als antioxidatives Enzym den Abbau von H_2O_2 in den Zellen. Durch die Überexpression der Katalase sollten die MCF-7kat und MCF-7kat Zellen weniger sensitiv gegen eine Schädigung

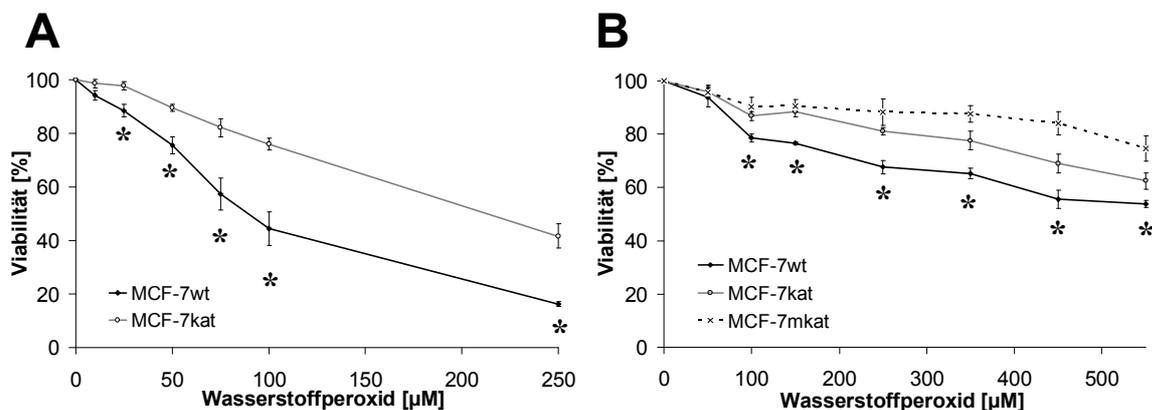


Abb.7: H₂O₂ Toxizität in MCF-7wt, MCF-7kat und MCF-7mkat Zellen.

24 h nach transienter Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit verschiedenen H_2O_2 Konzentrationen (A) ohne FCS oder (B) mit FCS inkubiert. 24 h nach der Schädigung wurde die Menge an viablen Zellen über einen (A) Neutralrottest (n=4, $x \pm SEM$, * $p < 0,05$ bezogen auf MCF-7kat, ANOVA) oder (B) ein MTT Assay ermittelt. Die prozentuale Menge an lebenden Zellen wurde in Bezug auf die jeweilige Kontrolle bestimmt (n=4, $x \pm SEM$, * $p < 0,05$ bezogen auf MCF-7kat & MCF-7kat, ANOVA).

mit H_2O_2 reagieren. Die MCF-7wt, MCF-7kat und MCF-7kat Zellen wurden 24 h nach der transienten Transfektion für 24 h mit H_2O_2 inkubiert. Abbildung 7A zeigt die Viabilität der MCF-7wt und MCF-7kat Zellen nach Inkubation mit H_2O_2 ohne FCS im

Medium. Die MCF-7kat Zellen waren signifikant resistenter gegen die durch H_2O_2 induzierte Zytotoxizität. Für die MCF-7kat Zellen wurde ein EC_{50} -Wert von ca. 230 μM bestimmt. Für die MCF-7wt Zellen dagegen war der EC_{50} -Wert schon bei 75 μM erreicht. Aus Erfahrungen einer anderen Arbeitsgruppe (AG Wätjen) war bekannt, dass Zellen in Gegenwart von FCS deutlich resistenter gegen eine Schädigung mit H_2O_2 reagierten. Zum Vergleich wurden die MCF-7wt, MCF-7kat und MCF-7kat Zellen mit H_2O_2 in Gegenwart von FCS im Medium inkubiert. In Abbildung 7B zeigt sich, dass die MCF-7wt Zellen wiederum am sensitivsten auf das H_2O_2 reagieren. Der EC_{50} -Wert für die MCF-7wt Zellen liegt hier bei ca. 500 μM . Die Katalase überexprimierenden Zellen sind signifikant resistenter gegen den H_2O_2 Stimulus. Der EC_{50} -Wert wurde weder für die MCF-7kat noch die MCF-7kat Zellen erreicht. Die MCF-7mkat Zellen zeigten eine minimale Abnahme der Viabilität nach Inkubation mit H_2O_2 . Im Vergleich zur H_2O_2 Inkubation ohne FCS bestätigte sich, dass die Zellen in Gegenwart von FCS deutlich resistenter gegen H_2O_2 waren. Als Letztes wurde die Fähigkeit der MCF-7wt, MCF-7kat und MCF-7kat Zellen bestimmt der Akkumulation von intrazellulärem H_2O_2 , nach Bolusgabe von 1 mM H_2O_2 , entgegen zu wirken. Die Menge an H_2O_2 in den Zellen wurde mithilfe der redox-sensitiven Sonde DCF-DA gemessen (Abb.8). Die Bolusgabe führte in den MCF-7wt Zellen zu einer Zunahme des intrazellulären H_2O_2 um das 5-fache nach 100 Minuten.

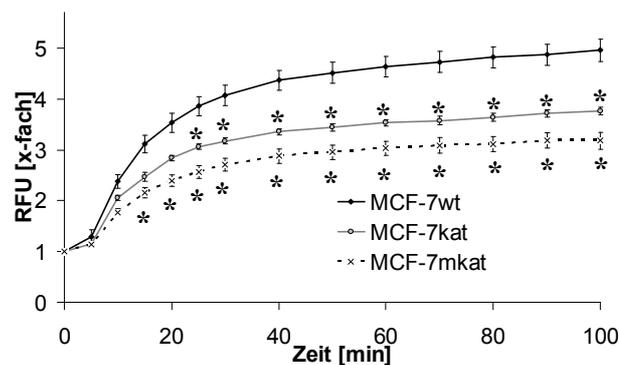


Abb.8: Katalase Überexpression und Akkumulation von intrazellulärem H_2O_2 .

24 h nach transienter Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit 50 μM H_2DCF -DA für 30 min vorinkubiert. Die Messung des intrazellulären H_2O_2 erfolgte im Plattenlesegerät für 100 min nach Zugabe von 1mM H_2O_2 . Die Ergebnisse sind als relative Fluoreszenzeinheiten in Bezug auf die jeweilige Kontrolle dargestellt (n=10, $x \pm SEM$, *p<0,05 bezogen auf MCF-7wt, ANOVA).

Für die MCF-7kat und MCF-7kat Zellen dagegen konnte eine signifikant geringere Akkumulation von H_2O_2 nachgewiesen werden. Die MCF-7mkat Zellen zeigten eine 3-fache, die MCF-7kat Zellen eine 3,5-fache Akkumulation von H_2O_2 .

Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Charakterisierung, dass die transiente Transfektion der MCF-7 Zellen mit den beiden Katalase Konstrukten zu einer

Überexpression funktionaler Katalase führte. Sowohl die Katalase mRNA als auch die Katalase Protein Mengen und ebenso die Katalase Aktivität waren in den MCF-7kat und MCF-7kat deutlich gegenüber den wt Zellen erhöht. Diese gesteigerte Expression der Katalase führte zu einem Schutz der Zellen gegen eine Inkubation mit H_2O_2 und gegen die Akkumulation von H_2O_2 nach Bolusgabe von 1 mM.

3.1.1.3 Einfluss der Katalase auf die TNF- α Wirkung

Im Folgenden wurde der Einfluss des antioxidativen Enzyms Katalase auf die Zytotoxizität von TNF- α in den MCF-7 Zellen untersucht. Es wurde vermutet, dass die Überexpression der Katalase die MCF-7 Zellen gegen den TNF- α vermittelten oxidativen Stress schützt. Um die Zytotoxizität von TNF- α in den MCF-7wt, MCF-7kat und MCF-7kat Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen transient mit dem jeweiligen Katalase Expressionsvektor transfiziert und für 48 h mit TNF- α stimuliert. Entgegen den Erwartungen führte die Überexpression der Katalase in den MCF-7kat und MCF-7kat Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der TNF- α induzierten Zytotoxizität gegenüber den MCF-7wt Zellen (Abb. 9). Für die MCF-7wt Zellen ergab sich ein EC_{50} -Wert von 15 ng/ml. Für die MCF-7kat und MCF-7kat Zellen lag der EC_{50} -Wert bei 5 ng/ml TNF- α .

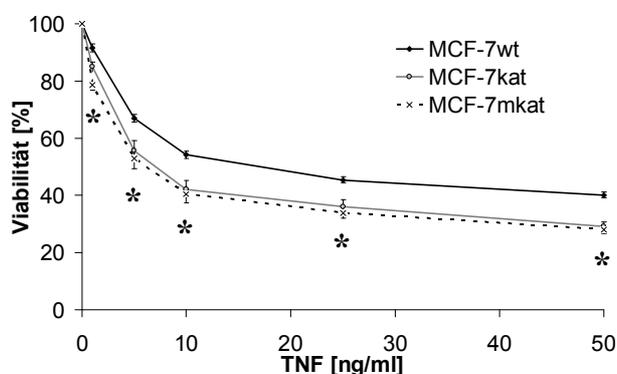


Abb.9: TNF- α Zytotoxizität in MCF-7wt, kat und mkat Zellen. 24 h nach transienter Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an humanem TNF- α für 48 h inkubiert. Die Menge an viablen Zellen wurde über ein MTT Assay bestimmt. Die prozentuale Menge an lebenden Zellen wurde in Bezug auf die jeweilige Kontrolle errechnet (n=5, $x \pm SEM$, * $p < 0,05$ bezogen auf MCF-7wt, ANOVA).

Um festzustellen, ob die erhöhte TNF- α Zytotoxizität in den MCF-7kat und MCF-7kat Zellen auch mit einer stärkeren Apoptose Induktion verbunden war, wurde die Aktivität der Effektorcaspase-3/-7 nach transienter Transfektion, und 48-stündiger TNF- α Inkubation bestimmt.

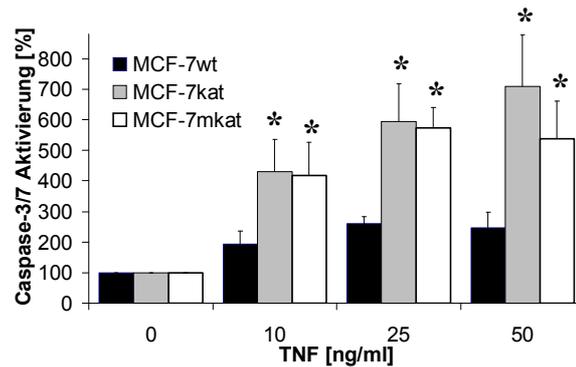


Abb.10: TNF- α induzierte Aktivierung von Caspase-3/7 in MCF-7wt, MCF-7kat und MCF-7mkat Zellen. 24 h nach transients Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an humanem TNF- α für 48 h inkubiert. Die Messwerte wurden auf die Proteinmenge normiert und sind als Prozentwert bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben. Caspase-3/7 Aktivierung (n=3-4, $x \pm$ SD, *p<0,05 signifikant gegen MCF-7wt, ANOVA),

Die TNF- α Inkubation führte sowohl in den MCF-7kat als auch in den MCF-7mkat Zellen zu einer etwa doppelt so starken, signifikanten Aktivierung der Caspase-3/7 im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen. Die Überexpression der Katalase in den Mitochondrien unterschied sich in ihrem Effekt auf die TNF- α Wirkung nicht von dem Effekt der zytosolisch überexprimierten Katalase. Daher wurden in den folgenden Versuchen nur mit den MCF-7wt und MCF-7kat Zellen weiter gearbeitet.

Der apoptotische Zelltod kann sowohl Rezeptor-vermittelt (extrinsisch) über eine

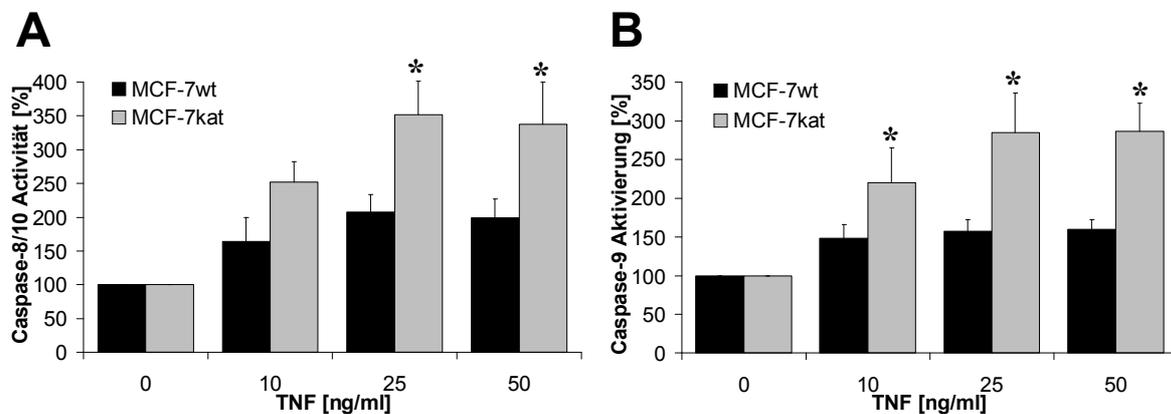


Abb.11: TNF- α induzierte Aktivierung von Caspasen in MCF-7wt und kat Zellen.

24 h nach transients Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an humanem TNF- α für 48 h inkubiert. Die Messwerte wurden auf die Proteinmenge normiert und sind als Prozentwert bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben. (A) Caspase-8/-10 Aktivierung (n=4, $x \pm$ SEM, *p<0,05 signifikant gegen MCF-7wt, ANOVA), (B) Caspase-9 Aktivierung (n=4, $x \pm$ SD, *p<0,05 signifikant gegen MCF-7wt, ANOVA).

Aktivierung der Initiatorcaspasen-8/-10 als auch von den Mitochondrien aus (intrinsisch) über die Initiatorcaspase-9 aktiviert werden (Jin und El-Deiry, 2005). Im Folgenden wurde die Aktivierung dieser Initiatorcaspasen bei der TNF- α vermittelten Apoptose im Vergleich zwischen den MCF-7wt und MCF-7kat Zellen untersucht.

Die MCF-7kat Zellen zeigten auch für die Initiatorcaspasen eine signifikant höhere Aktivierung im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen (Abb.11A+B). Die Caspasen-8/-10 waren in den MCF-7kat Zellen nach Inkubation mit 25 und 50 ng/ml TNF- α doppelt so stark aktiviert wie in den MCF-7wt Zellen (Abb.11A). Auch die Aktivierung der Caspase-9 erreichte bei 25 und 50 ng/ml TNF- α mit 300 % eine doppelt so hohe Aktivierung wie die bei den MCF-7wt Zellen mit 150 % (Abb.11B).

3.1.1.4 TNF- α abhängige Regulation antioxidativer Enzyme

Ein Mechanismus der TNF- α induzierten Zytotoxizität läuft über die Bildung von ROS an den Mitochondrien ab. Es kommt zu einer Freisetzung von Superoxidradikalanionen. Die MnSOD wandelt diese Superoxidradikalanionen zu H₂O₂ und O₂ um. Das durch die MnSOD gebildete H₂O₂ wird anschließend von der Katalase zu O₂ und H₂O disproportioniert. Es war bekannt, dass die MnSOD in

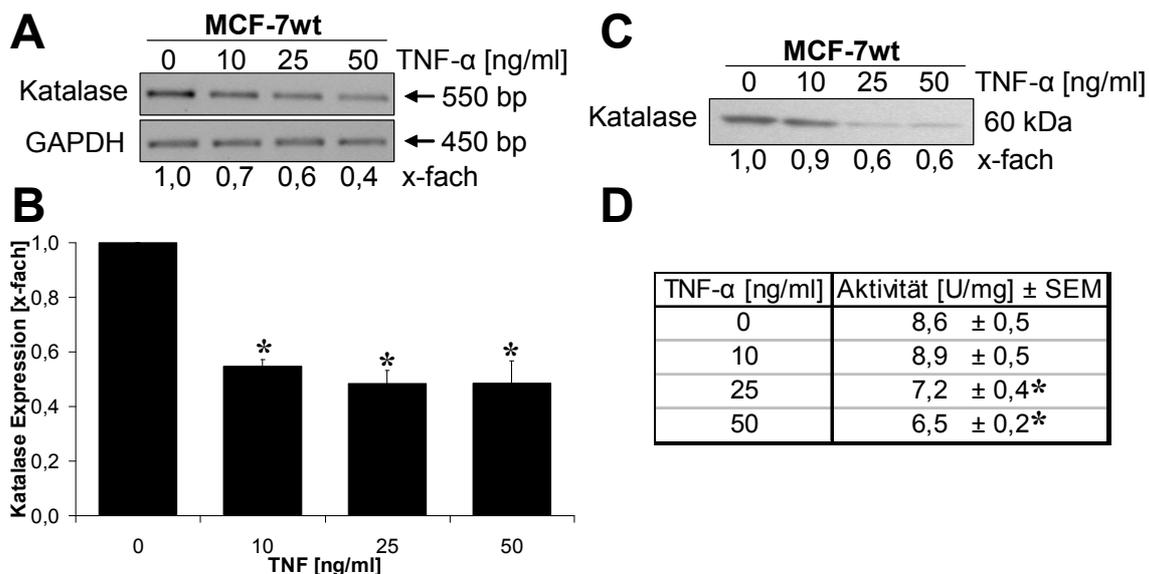


Abb.12: Katalase Expression nach Inkubation mit TNF- α für 48 h.

24 h nach transients Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an humanem TNF- α für 48 h inkubiert. Die Expression der Katalase wurde mittels **(A)** RT-PCR (n=3; PCR Bedingungen: Katalase: 1' 95°C, 1' 54°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen), **(B)** Realtime PCR (n=3, $x \pm$ SEM, *p<0,05 signifikant in Bezug zur Kontrolle, REST-Software), **(C)** Western Blot (n=3) und **(D)** Aktivitätsmessung (n=4, $x \pm$ SEM, *p<0,05 signifikant in Bezug zur Kontrolle, ANOVA) bestimmt.

einigen Zelllinien durch TNF- α Inkubation induziert wird (Liu *et al.*, 2000; Delhale *et al.*, 2002; Ranjan und Boss, 2006). Im Folgenden wurde die Regulation der antioxidativen Enzyme Katalase und MnSOD nach Inkubation mit TNF- α in den MCF-7wt Zellen überprüft. Abbildung 12 zeigt, dass die Katalase in den MCF-7wt Zellen durch die Inkubation mit TNF- α dosis-abhängig reprimiert wurde. Die signifikante Repression der Katalase auf mRNA Ebene konnte sowohl mittels

RT-PCR (Abb.12A) als auch über Realtime PCR (Abb.12B) nachgewiesen werden. Die Katalase mRNA Menge sank auf ein 0,4-faches im Vergleich zur Kontrolle ab. Die Katalase Proteinmenge (Abb.12C) wurde ebenfalls auf das 0,6-fache reduziert. Auch die Messung der Katalase Aktivität (Abb.12D) zeigte eine signifikante, dosisabhängige Repression. Neben der Regulation der Katalase wurde zusätzlich die Expression eines weiteren antioxidativen Enzyms betrachtet. Die MnSOD ist in den Mitochondrien lokalisiert und katalysiert dort den Abbau von Superoxidradikalanionen zu Wasserstoffperoxid. Im Gegensatz zu der in der Literatur selten beschriebenen Repression der Katalase (Yasmineh *et al.*, 1991; Beier *et al.*, 1997) ist die Induktion der MnSOD eine häufig beschriebene Eigenschaft der TNF- α Inkubation (Liu *et al.*, 2000; Delhale *et al.*, 2002; Ranjan und Boss, 2006). Die Regulation der MnSOD nach Inkubation mit TNF- α für 48 h wurde in den MCF-7wt und MCF-7kat Zellen auf Transkript und Protein Ebene untersucht. Abbildung 12A zeigt, dass es sowohl in den MCF-7wt Zellen, als auch in den MCF-7kat Zellen zu einer ca. 7-fachen Induktion der MnSOD kommt. Im Western Blot zeigte sich ebenfalls eine ca. 6-fache Induktion der MnSOD Proteinmenge in den

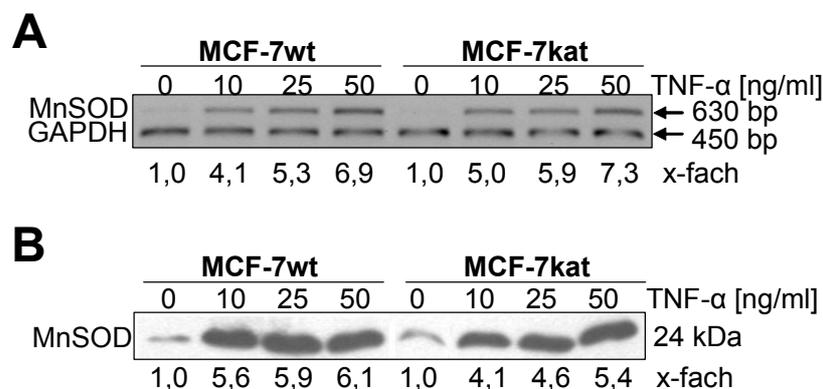


Abb.13: MnSOD Expression in MCF-7wt und kat Zellen nach Inkubation mit TNF- α für 48 h. 24 h nach transients Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an humanem TNF- α für 48 h inkubiert. Die Expression der MnSOD wurde mittels **(A)** RT-PCR (n=3; PCR Bedingungen: MnSOD: 1' 95°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen) und **(B)** Western Blot (n=3) bestimmt. Die Zahlenwerte geben die densitometrische Auswertung des dargestellten Western Blots wieder.

MCF-7wt und MCF-7kat Zellen. Um festzustellen, ob diese Regulation der antioxidativen Enzyme auf den Endpunkt der 48-stündigen TNF- α Inkubation beschränkt oder schon früh in der Inkubationsphase zu detektieren war, wurde die

Expression der Katalase und MnSOD in einer Kinetik nach Inkubation mit 50 ng/ml

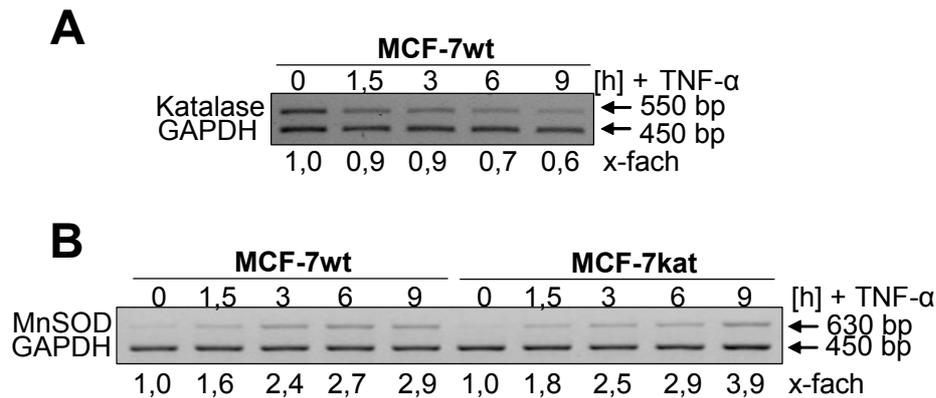


Abb.14: Katalase und MnSOD Expression in MCF-7 Zellen nach Inkubation mit 50 ng/ml TNF- α . 24 h nach transients Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit 50 ng/ml TNF- α für 0 - 9 h inkubiert. Die Expression **(A)** der Katalase und **(B)** der MnSOD wurde mittels RT-PCR ermittelt (n=3, PCR Bedingungen: Katalase: 1' 95°C, 1' 54°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; MnSOD: 1' 95°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen).

TNF- α untersucht. Die Inkubation der MCF-7wt Zellen mit 50 ng/ml TNF- α führte bereits in den ersten 9 h der TNF- α Inkubation zu einer Reduktion der Katalase mRNA Menge auf das 0,6-fache im Vergleich zur Kontrolle (Abb.14A). Auch die Induktion der MnSOD war bereits frühzeitig nachweisbar: Die MnSOD mRNA Menge wurde nach Inkubation mit TNF- α für 9 h sowohl in MCF-7wt als auch in MCF-7kat Zellen zeitabhängig auf das 3 - 4-fache Niveau der Kontrolle induziert (Abb.14B).

Die beiden antioxidativen Enzyme MnSOD und Katalase bilden in den Zellen zusammen einen Schutzmechanismus gegen reaktive Sauerstoffspezies. Die MnSOD erzeugt dabei in einer Reaktion aus Superoxidradikalanionen Wasserstoffperoxid, das im Anschluss durch die Katalase zu Sauerstoff und Wasser disproportioniert wird (Matés *et al.*, 2008). Durch die Induktion der MnSOD und die zeitgleiche Repression der Katalase war in den mit TNF- α behandelten MCF-7wt Zellen der Quotient MnSOD/Katalase reduziert. Die Reduktion ergab in den Zellen eine erhöhte Bereitstellung von Wasserstoffperoxid. In den MCF-7kat Zellen kam es zwar ebenfalls zu einer Induktion der MnSOD. Durch die Überexpression der Katalase wurde allerdings das vermehrt erzeugte H₂O₂ schneller und in größeren Mengen abgebaut.

3.1.1.5 TNF- α abhängige Regulation von NF- κ B

Das Zytokin TNF- α vermittelt durch Bindung an einen Rezeptor seine Effekte auf die Zellen. Neben der Induktion der Apoptose ist eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung des NF- κ B Signalweges ein charakteristischer Effekt von TNF- α . Die Aktivierung von

NF- κ B erfolgt in den Zellen zum Schutz gegen die TNF- α induzierte Apoptose (Bernard *et al.*, 2002). Da es sich bei NF- κ B um einen redox-sensitiven Transkriptionsfaktor handelt, kann auch eine Aktivierung durch H₂O₂ erfolgen (Baeuerle und Sies, 2000). Aufgrund der TNF- α vermittelten Regulation der antioxidativen Enzyme wurde vermutet, dass die Inkubation mit TNF- α zu einer Bereitstellung von H₂O₂ in den MCF-7wt Zellen führte. In den MCF-7kat Zellen dagegen wurde das H₂O₂ durch die überexprimierte Katalase stärker abgebaut. Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären H₂O₂ Menge und der TNF- α vermittelten Regulation des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B vorlag, wurde die Aktivierung von NF- κ B in den MCF-7wt und MCF-7kat Zellen im Vergleich untersucht. Im inaktiven Zustand ist der NF- κ B Transkriptionsfaktor, der aus 2 Untereinheiten besteht, im Zytoplasma an seinen Inhibitor I κ B gebunden. Bei einer Aktivierung von NF- κ B wird dieser Inhibitor

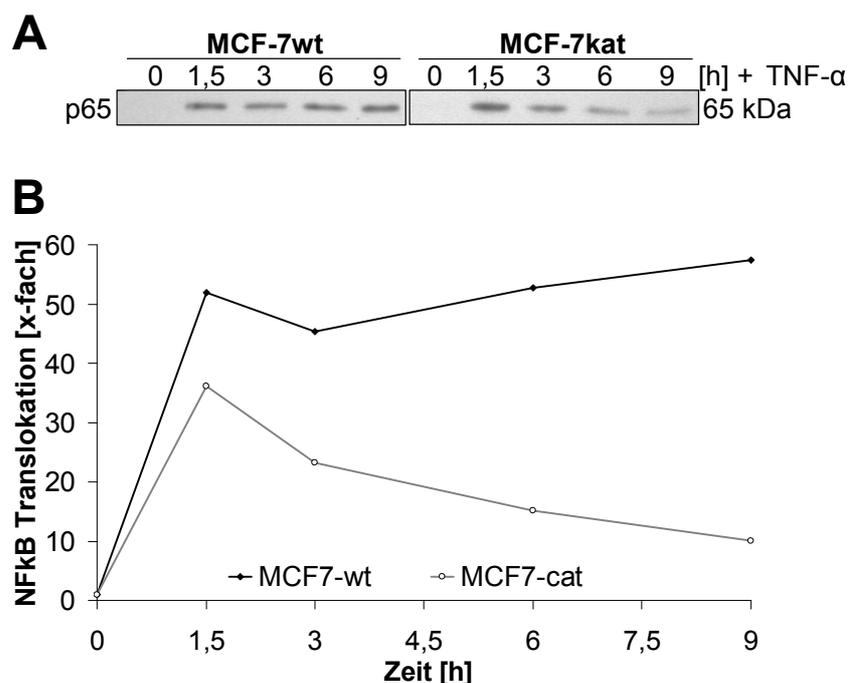


Abb.15: Katalase Überexpression und TNF- α induzierte NF- κ B Aktivierung.

24 h nach transientser Transfektion wurden die MCF-7wt und kat Zellen mit 50 ng/ml TNF- α für 0-9 h inkubiert. **(A)** Die Menge an nukleär lokalisiertem p65 wurde im Western Blot (n=3) detektiert. Unter **(B)** ist die densitometrische Auswertung des Western Blots unter **(A)** dargestellt. Die Menge an nukleär lokalisiertem p65 ist in Bezug auf die jeweilige Kontrolle angegeben.

phosphoryliert und degradiert. Dies führt zur Translokation des freigesetzten NF- κ B in den Zellkern. Im Kern kann das NF- κ B Dimer als Transkriptionsfaktor wirken (May und Ghosh, 1997; 1998). Da es sich bei der NF- κ B Aktivierung um ein früh

auftretendes Ereignis handelt, wurde die NF- κ B Translokation nach Inkubation mit 50 ng/ml TNF- α im Zeitverlauf untersucht.

Abbildung 15 zeigt für die MCF-7wt Zellen eine über 9 h anhaltende 50-fache Translokation der p65 Untereinheit in den Zellkern. Für die MCF-7kat Zellen dagegen wurde NF- κ B nur transient transloziert. Die Menge an p65 im Zellkern besaß mit einer 40-fachen Translokation in den Kern ein Maximum nach 1,5 h TNF- α Inkubation. In den darauffolgenden 7,5 h nahm die p65 Menge im Zellkern auf ein 10-faches der Kontrolle ab. Zum Beweis der Annahme, dass in den MCF-7kat Zellen H₂O₂ als Ko-Aktivator nicht ausreichend zur Verfügung stand, wurde eine Ko-Inkubation mit 50 ng/ml TNF- α und 1 mM H₂O₂ durchgeführt. Die Ko-Inkubation mit H₂O₂ und TNF- α führte in den MCF-7wt Zellen nach 30 Minuten zu einer

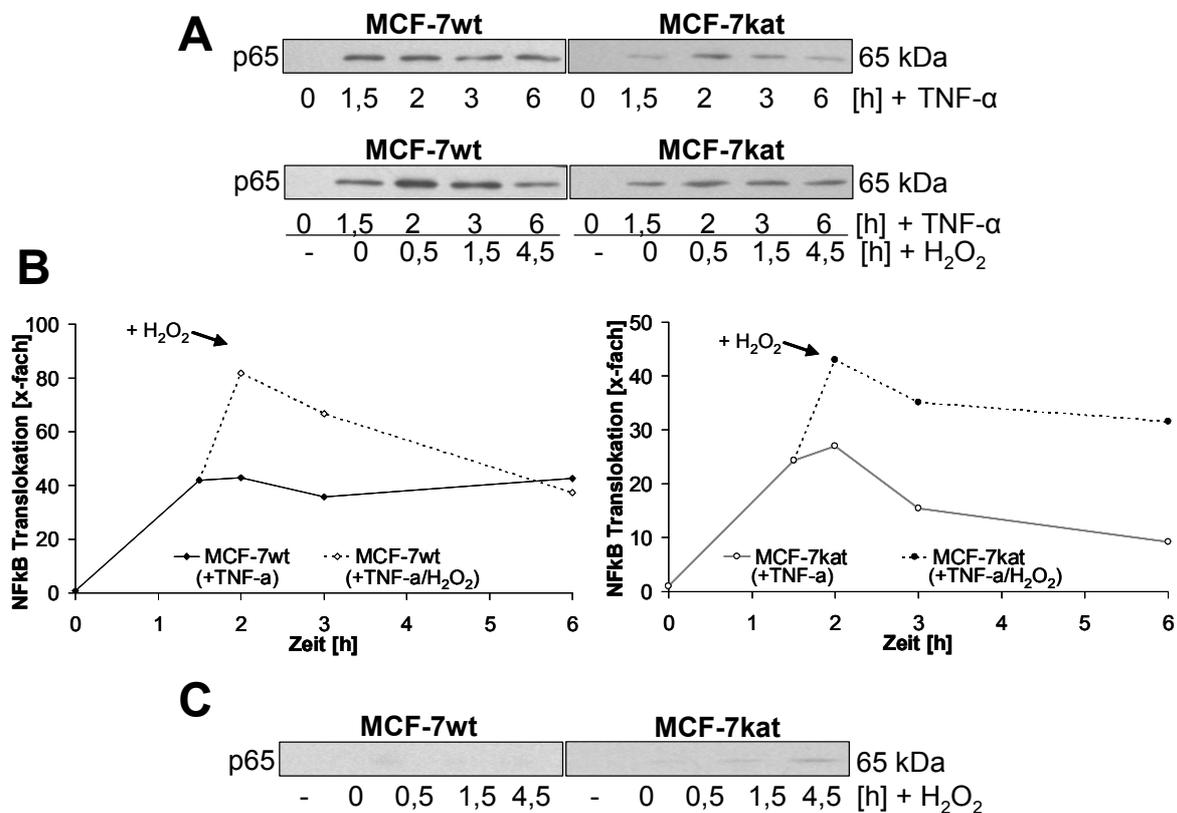


Abb.16: Wirkung von H₂O₂ auf die TNF- α induzierte NF- κ B Aktivierung.

24 h nach transients Transfektion wurden die MCF-7wt und kat Zellen entweder mit 50 ng/ml TNF- α inkubiert. Oder nach 1 ½ h Vorinkubation mit TNF- α erfolgte die Zugabe von 1,5 mM H₂O₂ für 4 ½ h. **(A)** Die Menge an nukleär lokalisiertem p65 wurde im Western Blot zu verschiedenen Zeitpunkten detektiert. Unter **(B)** ist die jeweilige densitometrische Auswertung dargestellt. Die Menge an nukleär lokalisiertem p65 ist in Bezug auf die jeweilige Kontrolle angegeben. **(C)** Translokation von p65 nach Inkubation mit 1,5 mM H₂O₂ alleine.

80-fachen Kerntranslokation von NF- κ B (densitometrische Auswertung Abb.16B - MCF-7wt). Über die nächsten 4 h normalisierte sich die NF- κ B Menge im Kern auf das Niveau der TNF- α behandelten MCF-7wt Zellen von 40-fach

(Abb.16A+B – MCF-7wt). In den MCF-7kat Zellen führte die Ko-Inkubation mit H_2O_2 und $TNF-\alpha$ zu einer Erhöhung der Kerntranslokation vom 25-fachen auf etwa das 40-fache (Abb.16A+B – MCF-7kat). Durch die Ko-Inkubation mit H_2O_2 konnte somit in den MCF-7kat Zellen das gleiche NF- κ B Niveau im Zellkern wie in den MCF-7wt Zellen erreicht werden (Abb.16B). Die Translokation blieb in den MCF-7kat Zellen über den gesamten Zeitraum der Ko-Inkubation konstant (Abb.16A+B – MCF-7kat), sodass sich durch die zusätzliche Gabe von H_2O_2 zumindest in den ersten 6 Stunden die transiente Translokation verhindert werden konnte.

Um sicher zu stellen, dass die deutlich stärkere Aktivierung und Translokation von NF- κ B in den Zellkern nicht auf ein synergistisches Zusammenwirken von $TNF-\alpha$ und H_2O_2 zurückzuführen war, wurden die MCF-7wt und MCF-7kat Zellen für die gleichen Zeitpunkte nur mit H_2O_2 inkubiert. Die Menge an p65 im Zellkern wurde erneut im Western Blot überprüft. Abbildung 16C macht deutlich, dass die Inkubation mit H_2O_2 in den MCF-7wt und MCF-7kat Zellen nur zu einer marginalen Translokation von NF- κ B in den Zellkern führte.

Durch das Fehlen von ausreichenden H_2O_2 Konzentrationen in den MCF-7kat Zellen wird der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- κ B nur transient aktiviert. Nach der Aktivierung reguliert NF- κ B im Zellkern durch Bindung an spezifische Promotor Elemente die Expression verschiedener Zielmoleküle. Unter Verwendung eines

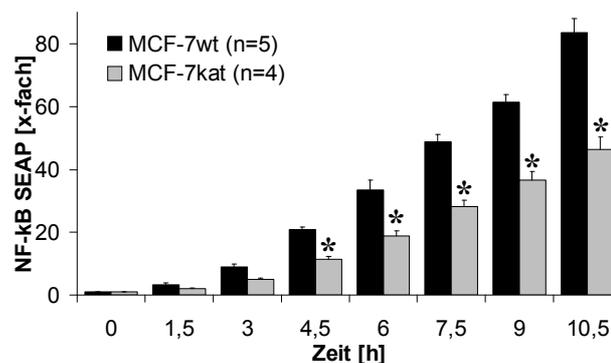


Abb.17: NF- κ B induzierte Reporterexpression nach Inkubation mit $TNF-\alpha$.

48 h nach transienter Ko-Transfektion mit einem NF- κ B SEAP-Reporter Plasmid wurden die MCF-7wt und kat Zellen mit 50 ng/ml $TNF-\alpha$ inkubiert. Die SEAP-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und ist als relative Reporter Expression in Bezug auf die jeweilige Kontrolle dargestellt (n=4-5, $x \pm$ SEM, *p<0,05 signifikant gegen MCF-7wt, ANOVA).

Reporterassays wurde die transkriptionelle Aktivierung von NF- κ B in den MCF-7wt und MCF-7kat Zellen nach Inkubation mit 50 ng/ml $TNF-\alpha$ untersucht. Der verwendete NF- κ B-Reporter beinhaltet 4 Tandem Kopien der NF- κ B *consensus* Sequenz, gekoppelt mit der sezernierten alkalischen Phosphatase (SEAP). Bei einer Aktivierung und Kerntranslokation von NF- κ B kam es zu einer Bindung von NF- κ B an

die NF- κ B *consensus* Sequenz. Diese Aktivierung des Reporters resultierte in einer Expression und Freisetzung der alkalischen Phosphatase in den Überstand. Die MCF-7 Zellen wurden mit dem NF- κ B-Reporterplasmid und der Katalase ko-transfiziert. Die MCF-7wt und MCF-7kat Zellen wurden 24 h nach der Ko-Transfektion mit 50 ng/ml TNF- α inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots des Zellüberstands abgenommen. Aus den Aliquots wurde die SEAP-Aktivität als Parameter für die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B bestimmt. Abbildung 17 zeigt die transkriptionelle Aktivierung von NF- κ B über die ersten 10,5 h der TNF- α Inkubation. In den MCF-7wt Zellen führte die Inkubation mit TNF- α zu einer 80-fachen Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B. Die MCF-7kat Zellen dagegen zeigten eine signifikant geringere 50-fache transkriptionelle Aktivierung von NF- κ B.

Die Überexpression der Katalase in den MCF-7kat Zellen führte im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen zu einer nur vorübergehenden Kern Translokation von NF- κ B aufgrund der geringeren intrazellulären Menge an H₂O₂ (s. Abb.15). Das Fehlen der konstanten NF- κ B Aktivierung in den Katalase überexprimierenden MCF-7kat Zellen resultierte daraus folgend in einer signifikant geringeren transkriptionellen Aktivierung von NF- κ B und somit einer abgeschwächten Aktivierung des NF- κ B Signalweges. Die MCF-7kat Zellen waren dadurch weniger gegen die TNF- α induzierte Zytotoxizität und Apoptose geschützt (Abb.9+10).

3.1.1.6 TNF- α abhängige Regulation weiterer Transkriptionsfaktoren

Die Rezeptor-vermittelte TNF- α Wirkung kann neben der Apoptose und der NF- κ B Aktivierung noch weitere Signalwege in den Zellen regulieren (Baud und Karin, 2001; Chen und Goeddel, 2002). Daher wurde neben dem redox-sensitiven Transkriptionsfaktor NF- κ B zusätzlich die Aktivierung zweier weiterer Transkriptionsfaktoren nach TNF- α Inkubation betrachtet. Bei AP-1 (*activator protein-1*) handelt es sich um dimere Transkriptionsfaktoren, die sich aus Jun, Fos oder ATF (*activating transcription factor*) Untereinheiten zusammensetzen können (Hess, 2004). Die AP-1 Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation der Apoptose beteiligt, wobei sie sowohl Apoptose induzierende Eigenschaften ausüben als auch als Inhibitor fungieren können (Hess *et al.*, 2004; Shaulian und Karin, 2001; 2002). Die Regulation der AP-1 Expression kann zusätzlich über NF- κ B erfolgen (Fujioka *et al.*, 2004). Der als Proto-Onkogen bekannte Transkriptionsfaktor c-Myc ist an der Regulation der Proliferation beteiligt, kann jedoch auch zur Induktion der

Apoptose in Tumorzellen beitragen (Bouchard *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2006). Zusätzlich kann eine Regulation der c-Myc Expression in den Zellen ebenfalls über NF- κ B erfolgen (Salminen *et al.*, 2008).

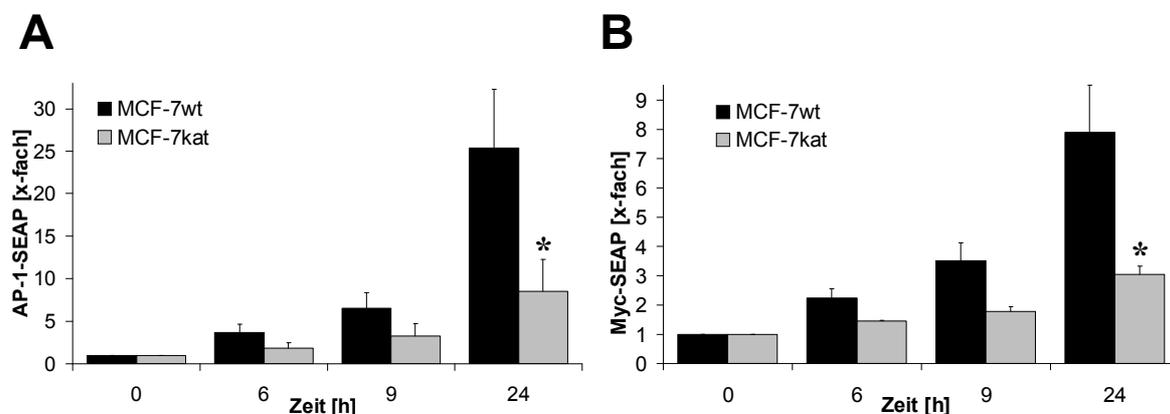


Abb.18: AP-1 und c-Myc induzierte Reporterexpression nach Inkubation mit TNF- α . 48 h nach transients Ko-Transfektion mit einem (A) AP-1 oder (B) c-Myc SEAP-Reporter Plasmid wurden die MCF-7wt und kat Zellen mit 50 ng/ml TNF- α inkubiert. Die SEAP-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und ist als relative Reporter Expression in Bezug auf die jeweilige Kontrolle dargestellt (n=4-5, \bar{x} \pm SEM, *p<0,05 signifikant gegen MCF-7wt, ANOVA).

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Reporterassays für AP-1 und c-Myc. Die MCF-7wt und MCF-7kat Zellen wurden erneut mit dem jeweiligen Reportervektor (AP-1: 4-fach Tandemrepeat des AP-1 *Enhancers*; c-Myc: 6-fach Tandemkopie der E-box) und der Katalase ko-transfiziert. Die transkriptionelle Aktivierung von AP-1 und c-Myc nach TNF- α Inkubation wurde erneut über die Menge an SEAP im Überstand bestimmt. Die Inkubation der MCF-7wt Zellen mit 50 ng/ml TNF- α führte zu einer 25-fachen Induktion der transkriptionellen Aktivierung von AP-1. Die MCF-7kat Zellen dagegen zeigten nur eine 10-fache, im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen signifikant geringere Zunahme der transkriptionellen Aktivierung von AP-1 (Abb.18A). Für die transkriptionelle c-Myc Aktivität zeigte sich ein ähnliches Bild. Die TNF- α Inkubation führte in den MCF-7kat Zellen zu einer 3-fachen Induktion. Diese war signifikant geringer als in den MCF-7wt Zellen, die eine 8-fache Aktivierung von c-Myc zeigten.

Zusammenfassend führte in den MCF-7wt Zellen die Inkubation mit dem Zytokin TNF- α zu einer Induktion der MnSOD und zusätzlich einer Repression der Katalase. Diese Regulation der antioxidativen Enzyme führte zu einer intrazellulären Akkumulation von H₂O₂, welches als *second messenger* für die Aktivierung des NF- κ B Signalweges benötigt wurde. In den MCF-7kat Zellen dagegen wurde durch die Überexpression der Katalase der Überschuss an H₂O₂ in den Zellen abgefangen.

Die Inkubation mit TNF- α resultierte deshalb in einer schwächeren, nur transienten Aktivierung von NF- κ B und einer stärkeren Aktivierung der Caspasen in den MCF-7kat Zellen. Zusätzlich zeigten die beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und c-Myc in den MCF-7kat Zellen eine geringere transkriptionelle Aktivität nach Stimulation mit TNF- α . Die Induktion der Apoptose überwog in den MCF-7kat Zellen und es kam zu einer stärkeren Sensitivierung der Zellen gegen den TNF- α Stimulus.

3.1.2 Katalase und FOXO3a

Für die MCF-7 Zellen konnte im vorherigen Abschnitt gezeigt werden, dass eine bestimmte physiologische Menge an intrazellulärem H₂O₂ vorhanden sein musste um für die Regulation des NF- κ B Signalweges als second messenger zu fungieren. Andere Signalwege in den Zellen können durch die Akkumulation von intrazellulärem H₂O₂ ebenfalls aktiviert, aber auch inaktiviert werden. Der Transkriptionsfaktor FOXO3a ist ein Beispiel für einen weiteren durch H₂O₂ regulierten Transkriptionsfaktor (Nemoto und Finkel, 2002; Yin *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2008). FOXO3a gehört zur Klasse O der Forkhead Transkriptionsfaktoren. Diese redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren sind unter anderem an der Regulation von Proliferation, Zell Zyklus, DNA Reparatur, oxidativem Stress und Apoptose beteiligt (Huang und Tindall, 2007). Die Lokalisation und Aktivität von FOXO3a wird unter anderem durch AKT abhängige Phosphorylierung reguliert. In seiner aktiven Form liegt FOXO3a nicht-phosphoryliert im Zellkern vor. Die Inaktivierung von FOXO3a erfolgt durch AKT-vermittelte Phosphorylierung und resultiert in einem Austransport von FOXO3a aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Huang und Tindall, 2007). Im Folgenden wurde in den MCF-7wt Zellen die Expression und Regulation von FOXO3a nach Inkubation mit TNF- α untersucht.

Die folgenden Versuche wurden mit 25 ng/ml TNF- α durchgeführt. Die Expression der FOXO3a mRNA in den MCF-7wt Zellen wurde nach Inkubation mit TNF- α für

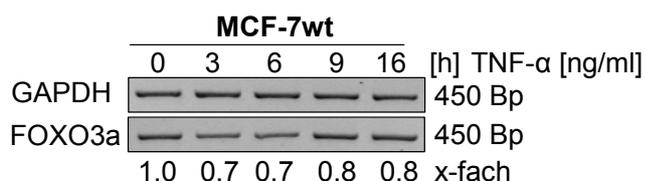


Abb.19: Regulation von FOXO3a (RT-PCR).

Die MCF-7wt Zellen wurden für 16 h mit 25 ng/ml TNF- α inkubiert. Die Expression von FOXO3a wurde mittels RT-PCR bestimmt (n=3; PCR Bedingungen: GAPDH: 1' 95°C, 45'' 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; FOXO3a: 1' 95°C, 1' 66°C, 2' 72°C, 29 Zyklen).

16 h überprüft. Nach 3 und 6 h TNF- α Inkubation war eine Repression der FOXO3a mRNA Menge auf ein 0,7-faches messbar. Nach 9 und 16 h war der FOXO3a mRNA Gehalt wieder auf ein 0,8-faches angestiegen (Abb.19). Weniger die Expression, sondern mehr die Phosphorylierung und Lokalisation von FOXO3a ist jedoch entscheidend für die Aktivität des Transkriptionsfaktors. Auf Protein Ebene wurde daher die Phosphorylierung und die intrazelluläre Verteilung von FOXO3a überprüft. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse für FOXO3a für die ersten 8 h der TNF- α Inkubation. Während sich die Gesamtmenge an FOXO3a über den Inkubationszeitraum von 8 h nicht veränderte, konnte ein deutlicher Einfluss von TNF- α auf die Lokalisation und Phosphorylierung von FOXO3a detektiert werden. Die Inkubation der MCF-7wt Zellen mit 25 ng/ml TNF- α führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung von FOXO3a. Daraus folgend wurde die nukleäre Menge an FOXO3a im Zellkern zeit-abhängig reduziert. Nach einer Inkubation von 5 h konnte die niedrigste Menge an FOXO3a in der nukleären Fraktion nachgewiesen werden. Nach 8 h konnte eine leichte Wiedererhöhung der im Zellkern lokalisierten FOXO3a Menge festgestellt werden (Abb.20).

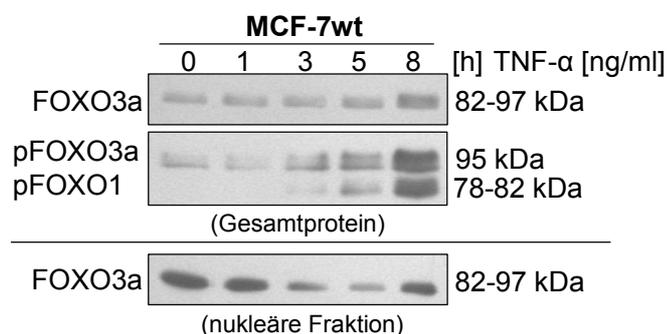


Abb.20: Regulation von FOXO3a.

Die MCF-7wt Zellen wurden für 8 h mit 25 ng/ml TNF- α inkubiert. Die Expression und Lokalisation von FOXO3a wurde im Western Blot mit einem FOXO3a Antikörper und einem Antikörper, der pFOXO3a (Threonin32) und pFOXO1 (Threonin24) erkennt überprüft (n=3).

Die TNF- α Inkubation in den MCF-7wt Zellen führte zu einer Phosphorylierung von FOXO3a und zu einem Austransport aus dem Zellkern. Aus der Literatur war bekannt, dass die Expression der antioxidativen Enzyme MnSOD, Peroxiredoxin III und Katalase durch FOXO3a reguliert werden kann (Kops *et al.*, 2002; Chiribau *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2008). Im Folgenden wurde die Rolle von FOXO3a bei der Regulation der Katalase in den MCF-7 Zellen untersucht. Dazu wurden die MCF-7wt Zellen für 8 h mit TNF- α inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression der Katalase auf Protein Ebene überprüft.

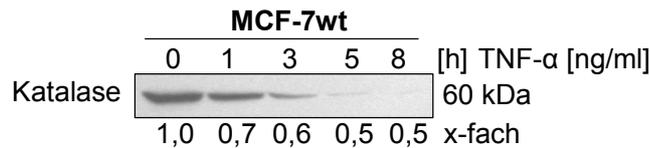


Abb.21: Expression der Katalase.

Die MCF-7wt Zellen wurden für 8 h mit 25 ng/ml TNF-α inkubiert. Die Expression der Katalase wurde im Western Blot überprüft (n=3).

Nach Inkubation der MCF-7wt Zellen mit 25 ng/ml TNF-α konnte eine zeitabhängige Repression der Katalase auf ein 0,5-faches nachgewiesen werden (Abb.21). Die TNF-α Inkubation der MCF-7wt Zellen hatte zu einer Inaktivierung von FOXO3a und parallel dazu zu einer Repression der Katalase geführt. Aus der Literatur war bekannt, dass FOXO3a an den Promotor der Katalase binden kann, sodass es zu einer transkriptionellen Aktivierung der Katalase kommt (Nemoto und Finkel, 2002; Tan *et al.*, 2008). Um eine direkte Verknüpfung zwischen FOXO3a und der Katalase in den MCF-7 Zellen herzustellen, wurde einerseits FOXO3a mittels transients Transfektion überexprimiert. Andererseits wurde die nukleäre Menge an FOXO3a in Katalase überexprimierenden MCF-7kat Zellen bestimmt.

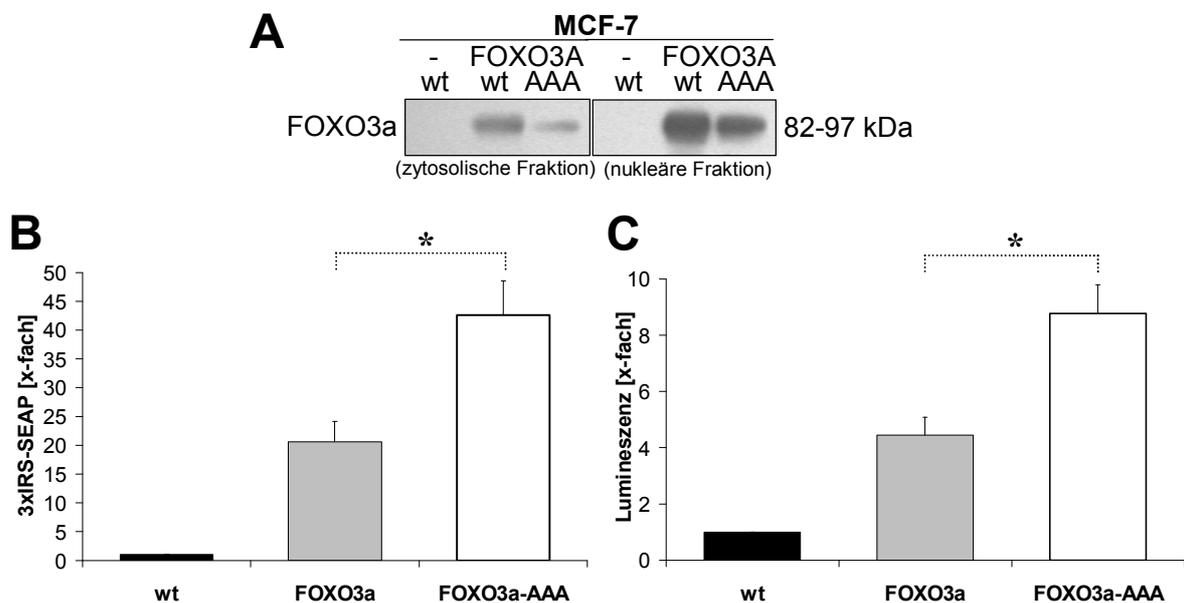


Abb.22: Expression von FOXO3a und FOXO3a-AAA in MCF-7wt Zellen.

48 h nach der transienten Transfektion wurde **(A)** die intrazelluläre Verteilung des FOXO3a nach Fraktionierung und zytosolische und nukleäre Fraktion im Western Blot untersucht. Die MCF-7 Zellen wurden transient mit einem 3xIRS-SEAP-Reporterkonstrukt oder dem pSE-Luc-Reporter und FOXO3a ko-transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Expression der SEAP im Zellüberstand und der Luziferase im Lysat bestimmt. **(B)** Die SEAP-Expression ist in Bezug zu den MCF-7wt Zellen angegeben (n=3, x±SEM, *p<0,05 signifikant gegen FOXO3a). **(C)** Die Luziferase-Lumineszenz nach Aktivierung des Selenoprotein P Promotors ist in Bezug zu den MCF-7wt Zellen angegeben (n=3, x±SD, *p<0,05 signifikant gegen FOXO3a).

Für die Überexpression von FOXO3a wurden zwei FOXO3a Konstrukte verwendet. Zum einen wurde FOXO3a Wildtyp (FOXO3a) in den MCF-7 Zellen überexprimiert (Ramaswamy *et al.*, 2002). Zum anderen wurde ein Expressionsvektor verwendet, der ein mutiertes FOXO3a kodiert (FOXO3a-AAA), das an allen drei AKT Phosphorylierungsstellen durch Basenaustausch von Threonin zu Alanin nicht mehr phosphoryliert werden kann und somit konstitutiv aktiv im Zellkern vorliegt (Ramaswamy *et al.*, 2002). Die Expression der beiden FOXO3a Konstrukte in den MCF-7wt Zellen wurde zunächst charakterisiert.

Die Verteilung von FOXO3a und FOXO3a-AAA auf Zytosol und Zellkern wurde nach Überexpression in den MCF-7 Zellen mit Hilfe eines Western Blots überprüft. Abbildung 22A zeigt, dass die Überexpression von FOXO3a in einer intermediären Verteilung zwischen Zytosol und Zellkern resultierte. Die Expression des konstitutiv aktiven FOXO3a-AAA dagegen führte in den MCF-7 Zellen zu einer geringen Expression im Zytosol und einer deutlichen Expression im Zellkern. Die Funktionalität der beiden FOXO3a Konstrukte wurde in zwei Reporterassays getestet. Das 3-fach Repeat des „*Insulin Responsiven Elements*“ aus dem 3xIRS-Luc Vektor (Matzusaki *et al.*, 2005a) wurde für das SEAP Reporterassay in den pTAL-SEAP Reportervektor umkloniert. In Abbildung 23 ist die Strategie für die Umklonierung dargestellt. Für das Reporterassay wurden die Zellen mit dem jeweiligen FOXO3a Konstrukt und dem 3xIRS-SEAP Reporter ko-transfiziert.

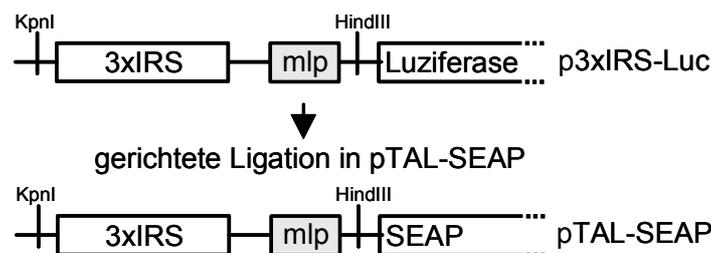


Abb.23: Umklonierung der 3xIRS in den pTAL-SEAP Vektor.

Die 3xIRS und der nachgeschaltete „major late promotor (mlp)“ wurden mit Hilfe von *KpnI* und *HindIII* aus dem Luziferase Vektor gerichtet in den pTAL-SEAP Reportervektor umkloniert. Der SEAP-Reporter vereinfacht die Aufnahme von Kinetik Werten. Die SEAP wird nach der Expression in den Überstand freigesetzt und kann ohne eine Lyse der Zellen in einem Aliquot des Zellüberstandes detektiert werden.

Aus Abbildung 22B geht hervor, dass die MCF-7FOXO3a-AAA Zellen eine signifikante, doppelt so starke transkriptionelle Aktivität besaßen wie die MCF-7FOXO3a Zellen. Zusätzlich zur Überexpression und Funktionalität wurde der Einfluss von FOXO3a auf den Promotor des Selenoproteins P untersucht

(Walter *et al.*, 2008). Dazu wurden die Zellen erneut mit den FOXO3a Konstrukten und einem Luziferase Reportervektor der den Promotor des Selenoproteins P trägt transient ko-transfiziert (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Klotz, Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf, Deutschland; Mostert *et al.*, 2001). 48 h nach der Transfektion wurde die Luziferasemenge in den Zellen gemessen. Die FOXO3a Überexpression führte zu einer etwa 5-fachen Aktivierung des Luziferase Reporters. Die Transfektion mit dem konstitutiv aktiven FOXO3a-AAA erhöhte die transkriptionelle Aktivität im Vergleich zu den MCF-7FOXO3a Zellen signifikant auf ein ca. 9-faches (Abb.22C).

Um zu überprüfen, ob die Katalase in den MCF-7 Zellen über FOXO3a reguliert wird und ob die intrazelluläre H₂O₂ Konzentration einen Einfluss auf die FOXO3a Regulation hat, wurden in den MCF-7 Zellen entweder die Katalase oder FOXO3a transient überexprimiert. Im Western Blot wurde die nukleäre Menge an FOXO3a nach Katalase Überexpression und die Expression der Katalase nach Überexpression von FOXO3a untersucht. Abbildung 24A zeigt die nukleäre Menge an FOXO3a in MCF-7wt und MCF-7kat Zellen. Die Überexpression der Katalase in den MCF-7kat Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion der nukleären FOXO3a



Abb.24: Katalase und FOXO3a.

(A) Die nukleäre Menge von FOXO3a in MCF-7wt und MCF-7kat Zellen wurde 48 h nach der Transfektion im Western Blot untersucht. **(B)** Die MCF-7 Zellen wurden transient mit dem jeweiligen FOXO3a Konstrukt transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Expression von FOXO3a und Katalase mittels Western Blot bestimmt.

Menge. Die Überexpression von FOXO3a Wildtyp und FOXO3a-AAA führte wiederum in den MCF-7 Zellen zu einer Induktion der Katalase Proteinmenge. Das Ausmaß der Katalase Protein Expression in den FOXO3a und den FOXO3a-AAA Zellen war vergleichbar (Abb.24B).

Es konnte somit gezeigt werden, dass bei einer Überexpression der Katalase die nukleäre FOXO3a Menge reduziert war. Daher wurde als Nächstes einerseits die TNF- α abhängige Regulation von FOXO3a in MCF-7kat Zellen untersucht. Da die Überexpression von FOXO3a zusätzlich auf Proteinebene zu einer Induktion der Katalase führte, wurde andererseits konstitutiv aktives FOXO3a-AAA in den Zellen

exprimiert und die TNF- α abhängige Regulation der Katalase Expression untersucht. Die MCF-7kat und MCF-7FOXO3a-AAA Zellen wurden jeweils für 8 h mit 25 ng/ml TNF- α inkubiert und entweder die nukleäre FOXO3a Menge oder die Expression der Katalase zu verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot überprüft. Die Inkubation der Katalase überexprimierenden MCF-7kat Zellen mit TNF- α führte zu einer zeitabhängigen Zunahme der nukleären FOXO3a Menge (Abb.25A). Abbildung 25B wiederum zeigte, dass die FOXO3a-AAA überexprimierenden MCF-7 Zellen keine Repression der Katalase nach Inkubation mit TNF- α entwickelten.

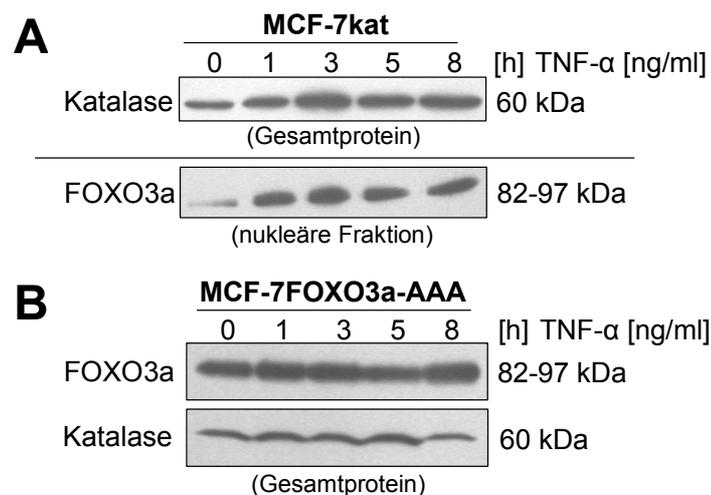


Abb.25: Katalase, FOXO3a und TNF- α .

Die MCF-7 Zellen wurden transient mit **(A)** der Katalase (n=3) oder **(B)** dem FOXO3a-AAA Konstrukt transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 8 h mit 25 ng/ml TNF- α inkubiert und die Expression von FOXO3a und Katalase im Western Blot bestimmt.

Die beiden Western Blots zeigten, dass die Überexpression der Katalase zu einem nukleären Import von FOXO3a führte. Die Überexpression von FOXO3a-AAA verhinderte außerdem die Repression der Katalase. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass die durch die Überexpression von FOXO3a-AAA in den MCF-7 Zellen verhinderte Repression der Katalase durch TNF- α zu einer Sensitivierung gegen TNF- α führen könnte. Andererseits ist für FOXO3a bekannt, dass die Kerntranslokation zu einer Einleitung des Zelltods führen kann (Urbich *et al.*, 2005; Fernandez de Mattos *et al.*, 2008; Stan *et al.*, 2008). Die MCF-7 Zellen wurden daher erneut mit FOXO3a-AAA transient transfiziert und für 48 h mit verschiedenen TNF- α Konzentrationen inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde nach Ende der Inkubation über ein MTT-Assay bestimmt. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Viabilitätstests. Die Überexpression von FOXO3a-AAA führte in den MCF-7FOXO3a-AAA Zellen, im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen, erwartungsgemäß zu einer Sensitivierung gegen TNF- α . Der EC₅₀-Wert für die MCF-7wt Zellen lag bei ca. 30 ng/ml TNF- α . Für die

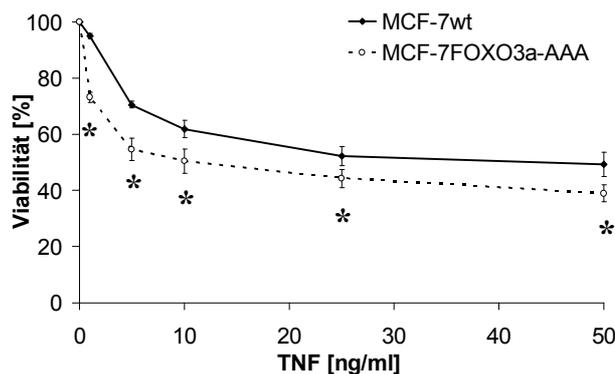


Abb.26: TNF- α vermittelte Zytotoxizität in MCF-7wt und MCF-7FOXO3a-AAA Zellen. 48 h nach transienter Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an humanem TNF- α für 48 h inkubiert. Die Menge an viablen Zellen wurde über ein MTT-Assay bestimmt. Die prozentuale Menge an lebenden Zellen wurde in Bezug auf die jeweilige Kontrolle errechnet (n=4, $x \pm$ SEM, *p<0,05 bezogen auf MCF-7wt, ANOVA).

MCF-7FOXO3a-AAA Zellen konnte ein EC_{50} -Wert von ca. 10 ng/ml TNF- α bestimmt werden.

3.1.3 Katalase und Doxorubicin in Hct-116 Zellen

Für die folgenden Versuche wurden Hct-116 Kolon-Karzinom Zellen mit dem Anthrazyklinderivat Doxorubicin behandelt. Im Gegensatz zu TNF- α erzeugt Doxorubicin keinen Rezeptor-vermittelten oxidativen Stress, sondern fungiert in den Zellen als Redox-Zyklus (Berthiaume und Wallace, 2007). Die Wirkung der Katalase Überexpression auf die Doxorubicin Wirkung wurde mithilfe einer Überexpression der Katalase im Zytosol untersucht (Lüpertz *et al.*, 2008).

3.1.3.1 Charakterisierung der Katalase Expression

Wie auch die MCF-7 Zellen wurden die Hct-116 Zellen transient mit humaner Katalase cDNA transfiziert. Zur Charakterisierung der Katalase Überexpression wurde die Expression der Katalase mRNA, des Katalase Proteins und die Katalase Aktivität im Vergleich zwischen Hct-116wt und Hct-116kat Zellen 24 - 48 h nach der Transfektion bestimmt. Die Hct-116kat Zellen zeigten im Vergleich zu den Hct-116wt Zellen eine deutlich erhöhte Katalase mRNA Expression (Abb.27A). Auch die Katalase Proteinmenge war in den Hct-116kat Zellen gegenüber den Hct-116wt deutlich erhöht (Abb.27B). Neben der Proteinmenge wurde über eine Bestimmung der Katalase Aktivität auch die Funktionalität getestet. In den Hct-116kat Zellen konnte eine 5-fach signifikante Erhöhung der Katalase Aktivität gemessen werden (Abb.27C). Um die Funktionalität der Katalase auch gegenüber einem exogenen Stimulus zu testen, wurde ein Zytotoxizitätsassay mit H_2O_2 durchgeführt. Abbildung

29D zeigt, dass die Hct-116kat Zellen resistenter gegen die H_2O_2 induzierte Zytotoxizität waren.

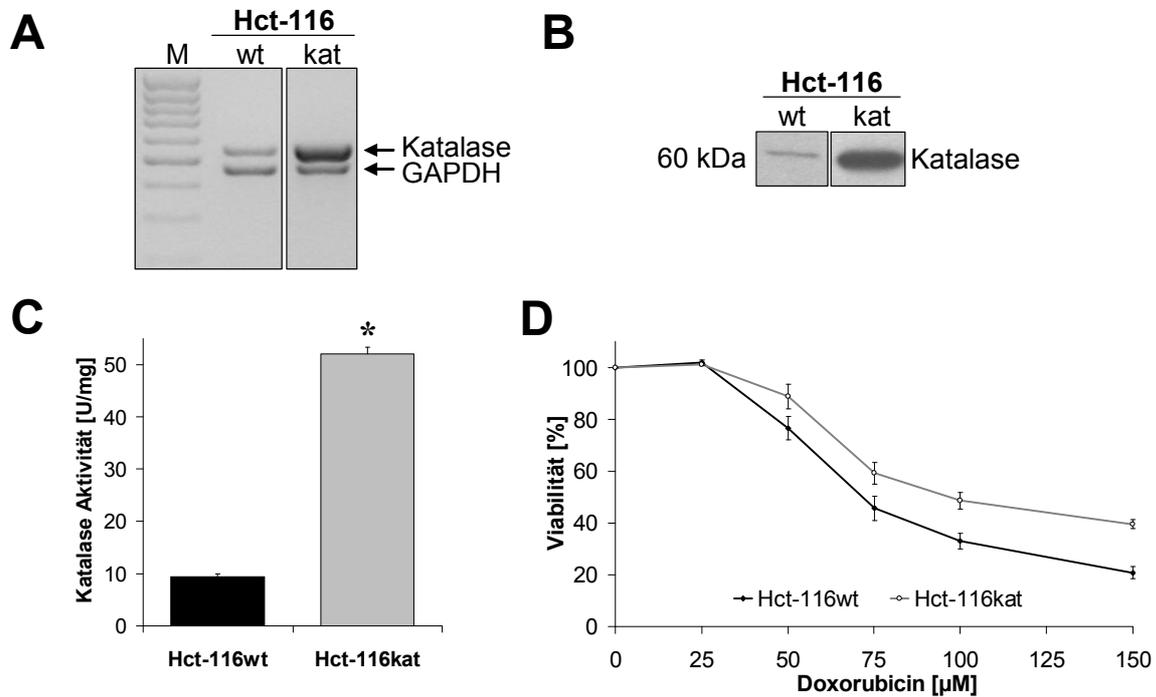


Abb.27: Katalase Überexpression in Hct-116 Zellen.

24 h nach der transienten Transfektion wurde die Expression der Katalase in Hct-116wt und Hct-116kat Zellen untersucht. Nachweis der Katalase Expression mittels **(A)** RT-PCR (n=3, PCR-Bedingungen: Katalase: 1' 95°C, 1' 54°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen) und **(B)** Western Blot (n=3). **(C)** Photometrische Bestimmung der Katalase Aktivität (n=4, $x \pm SD$, * $p < 0,05$ bezogen auf die MCF-7wt Zellen, ANOVA). **(D)** 24 h nach transienter Transfektion wurden die Hct-116 Zellen mit verschiedenen H_2O_2 Konzentrationen mit FCS inkubiert. 24 h nach der Schädigung wurde die Menge an viablen Zellen über ein MTT-Assay bestimmt. Der prozentuale Anteil an lebenden Zellen wurde in Bezug auf die jeweilige Kontrolle berechnet (n=5, $x \pm SEM$).

3.1.3.2 Einfluss der Katalase auf die Doxorubicin Wirkung

Das Anthrazyklinderivat Doxorubicin vermittelt die Induktion von ROS in den behandelten Zellen (Berthiaume und Wallace, 2007). Durch die Überexpression der Katalase sollte die antioxidative Abwehr der Zellen gestärkt werden und so die Akkumulation der ROS bei der Doxorubicin Inkubation abgeschwächt werden. Für

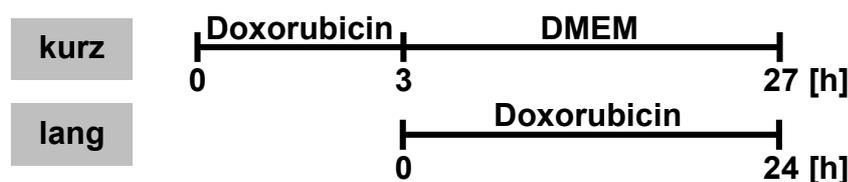


Abb.28: Doxorubicin Inkubationsschematas.

die folgenden Versuche wurden zwei verschiedene Inkubationsformen für die Hct-116 Zellen verwendet. Zum einen wurde eine Kurzzeit Inkubation durchgeführt, bei der die Hct-116 Zellen für 3 h mit Doxorubicin inkubiert wurden. Anschließend folgte eine Regenerationsphase für 24 h in frischem Wachstumsmedium (Abb.28 kurz). Zum anderen wurde die Hct-116 Zellen kontinuierlich für 24 h Stunden mit Doxorubicin inkubiert (Abb.28 lang). Diese Inkubation wurde im Folgenden als Langzeit Inkubation bezeichnet. Um den Einfluss der Katalase auf die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität zu bestimmen, wurden die Hct-116 Zellen transient mit der humanen Katalase überexprimiert und 24 h nach der Transfektion kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert.

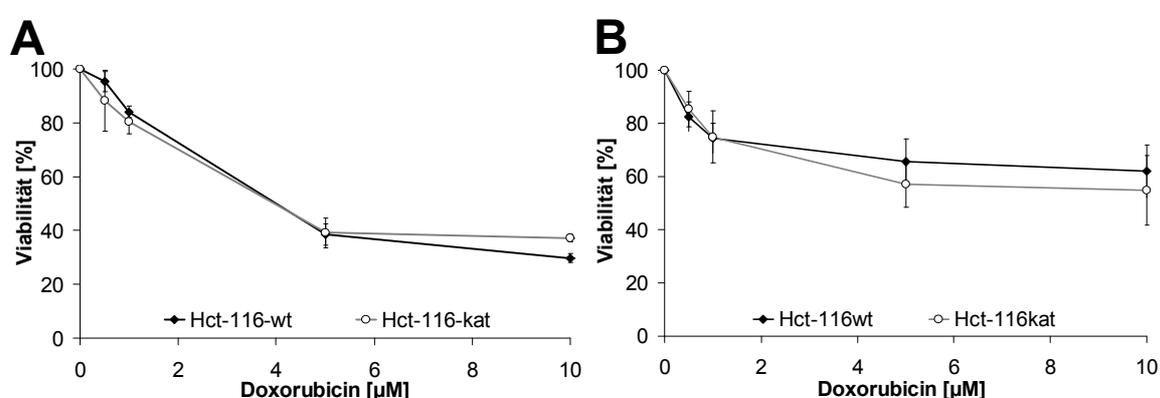


Abb.29: Doxorubicin Zytotoxizität nach Katalase Überexpression.

24 h nach transients Transfektion wurden die Hct-116wt und kat Zellen **(A)** kurz oder **(B)** lang mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin inkubiert. 24 h nach der Schädigung wurde die Menge an viablen Zellen über ein MTT-Assay gemessen. Die Viabilität ist als prozentualer Anteil bezogen auf die Kontrolle dargestellt (n=5, $x \pm \text{SEM}$).

Die Abbildungen 29A und B zeigen die zugehörigen Ergebnisse der beiden Zytotoxizitätsassays. Sowohl für eine Lang- als auch eine Kurzzeit Inkubation mit Doxorubicin ergab sich kein Einfluss der Katalase Überexpression auf die Doxorubicin induzierte Zytotoxizität. Sowohl für die Kurzzeit inkubierten Hct-116wt Zellen, als auch für die Hct-116kat Zellen wurde ein EC_{50} -Wert von ca. 4 μM ermittelt. Bei der Langzeit Inkubation war der EC_{50} -Wert für Hct-116wt und Hct-116kat Zellen nur abschätzbar, da bereits bei einer Inkubation mit 3 - 4 μM Doxorubicin ein Plateau bei ca. 55 % viablen Zellen erreicht wurde.

3.1.3.3 Doxorubicin abhängige Regulation antioxidativer Enzyme

In den Hct-116 Zellen hatte die Katalase Überexpression weder bei einer Kurzzeit, noch bei einer Langzeit Inkubation einen Effekt auf die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität. Da die Doxorubicin Inkubation für Kurz- und Langzeit jedoch einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf die Zellen hatte, wurde die Wirkung des

Doxorubicin weiter untersucht. Doxorubicin kann als Redox-Zyklus ROS in Zellen erzeugen (Wagner *et al.*, 2005; Bernuzzi *et al.*, 2008). Daher wurde die Regulation der antioxidativen Enzyme Katalase und MnSOD auf mRNA- und Proteinebene betrachtet. Sowohl die Kurz- als auch die Langzeit Inkubation der Hct-116wt Zellen mit Doxorubicin führte zu einer Repression der Katalase auf mRNA Ebene (Abb.30A). Die Katalase wurde nach der Kurzzeit Inkubation auf das 0,4-fache und nach der Langzeit Inkubation auf das 0,7-fache im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Auch auf Protein Ebene konnte die Repression der Katalase detektiert werden (Abb.30B). Nach der Kurzzeit Inkubation sank hier die Proteinmenge auf das 0,6-fache und nach der Langzeit Inkubation auf das 0,7-fache. Die MnSOD zeigte auf mRNA Ebene nach einer Kurzzeit Inkubation mit Doxorubicin nur eine minimale Repression auf das 0,9-fache. Nach einer Langzeit Inkubation dagegen war die MnSOD mRNA Menge auf das 0,5-fache reduziert (Abb.30A). Auf Protein Ebene war nach Kurzzeit Inkubation mit 5 μ M Doxorubicin eine Induktion der MnSOD

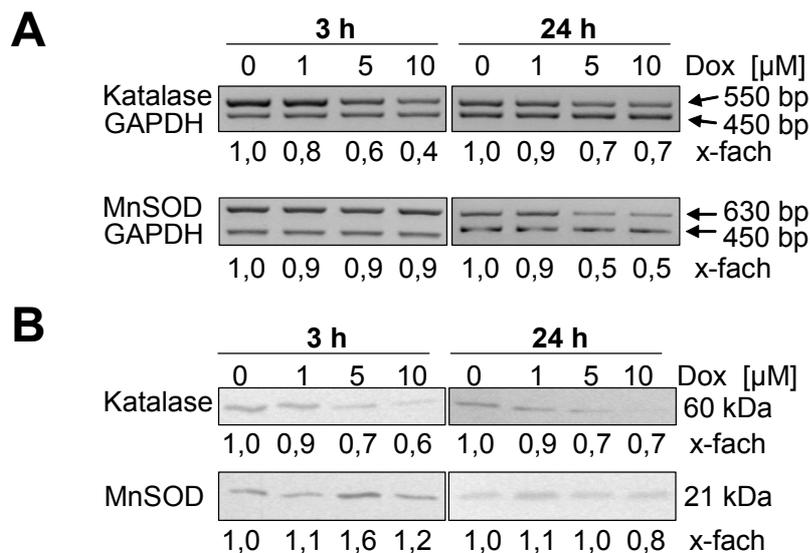


Abb.30: Regulation von MnSOD und Katalase nach Inkubation mit Doxorubicin.

Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert. Die Expression von MnSOD und Katalase wurde mittels **(A)** RT-PCR (n=3, PCR Bedingungen: Katalase: 1' 95°C, 1' 54°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; MnSOD: 1' 95°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen) und **(B)** Western Blot (n=3) bestimmt.

auf das 1,6-fache zu erkennen. Die Langzeit Inkubation resultierte dagegen in einer 0,8-fachen Reduktion der MnSOD Protein Menge (Abb.30B).

Aufgrund der differenziellen Regulation der beiden antioxidativen Enzyme wurde die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in den Hct-116wt Zellen nach Doxorubicin Inkubation bestimmt. Die Doxorubicin Inkubation führte sowohl nach kurzer als auch nach langer Stimulation der Hct-116 Zellen mit Doxorubicin zu einer Induktion der

intrazellulären ROS Menge. Es zeigte sich allerdings ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Inkubationszeiträumen (Abb.31). Nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin konnte in den Kurzzeit inkubierten Zellen keine Induktion von ROS nachgewiesen werden. Die Langzeit Inkubation dagegen zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung der ROS auf das 2,5-fache. Sowohl die Kurzzeit als auch die Langzeit Inkubation mit 5 μM resultierten in einer ca. 2,5-fachen signifikanten Akkumulation von ROS im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Inkubation mit 10 μM kam es in den Kurzzeit inkubierten Zellen zu einer signifikanten 1,5-fachen Zunahme der ROS. Die Langzeit Inkubation resultierte im Vergleich dazu in einer signifikanten Induktion der ROS auf das 3,5-fache.

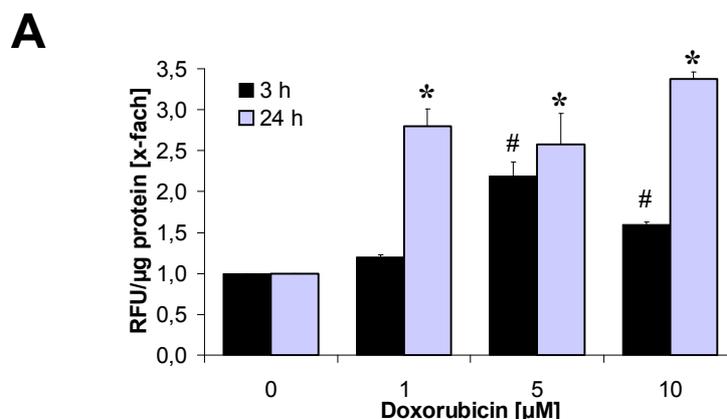


Abb.31: Akkumulation von intrazellulären ROS nach Inkubation mit Doxorubicin.

Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit Doxorubicin und 50 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ko-inkubiert. Die Messung der intrazellulären ROS erfolgte im Plattenlesegerät nach Ende der Inkubation. Die Ergebnisse sind als relative Fluoreszenzeinheiten in Bezug auf die jeweilige Kontrolle dargestellt ($n=3$, $x \pm \text{SEM}$, $^{* \#} p < 0,05$ bezogen auf die jeweilige Kontrolle, ANOVA).

Die Doxorubicin Inkubation führte demnach bei Lang- und Kurzzeit Inkubationen mit Doxorubicin zu einer Repression der Katalase und zum Anstieg der intrazellulären ROS Menge. Die Überexpression der Katalase hatte jedoch keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von Doxorubicin. Zusätzlich zur Katalase Expression wurde bei einer 24-stündigen Inkubation mit Doxorubicin die MnSOD Expression herunterreguliert.

3.2 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin

Der zweite Teil dieser Arbeit beinhaltet weitere Versuche, die mit dem Anthrazyklinderivat Doxorubicin durchgeführt wurden. Das Zytostatikum Doxorubicin wird klinisch für die Behandlung eines breiten Spektrums an Tumoren verwendet (Hortobagyi, 1997). Doxorubicin kann die Topoisomerase II hemmen, in die DNA interkalieren, eine Quervernetzung der DNA-Stränge auslösen und als Redox-Zyklus die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren (Gerwitz, 1999; Berthiaume und Wallace, 2007). Sowohl die Wirkung auf die DNA als auch die Induktion der ROS kann in den Zellen zur Aktivierung verschiedener Signalwege führen, die über das Schicksal der Zelle entscheiden. Bekannte Signalwege, die aktiviert werden, sind der NF- κ B Signalweg (Chovolou *et al.*, 2007), der PI3K/AKT Signalweg (Yu *et al.*, 2008) und der Tumorsuppressor p53 Signalweg (Wang *et al.*, 2004). Im Folgenden wurde die Wirkung des Doxorubicins auf die Hct-116 Kolon-Karzinom Zellen bei Kurz- und Langzeit Inkubation durch Betrachtung verschiedener Endpunkte näher untersucht.

3.2.1 Zytotoxizität

Zur Charakterisierung der Doxorubicin Wirkung in Hct-116 Zellen wurde als Erstes die zytotoxische Wirkung betrachtet. Die Viabilität der Zellen wurde nach Ende der Inkubation mithilfe eines Neutralrot Tests und eines MTT Assays bestimmt.

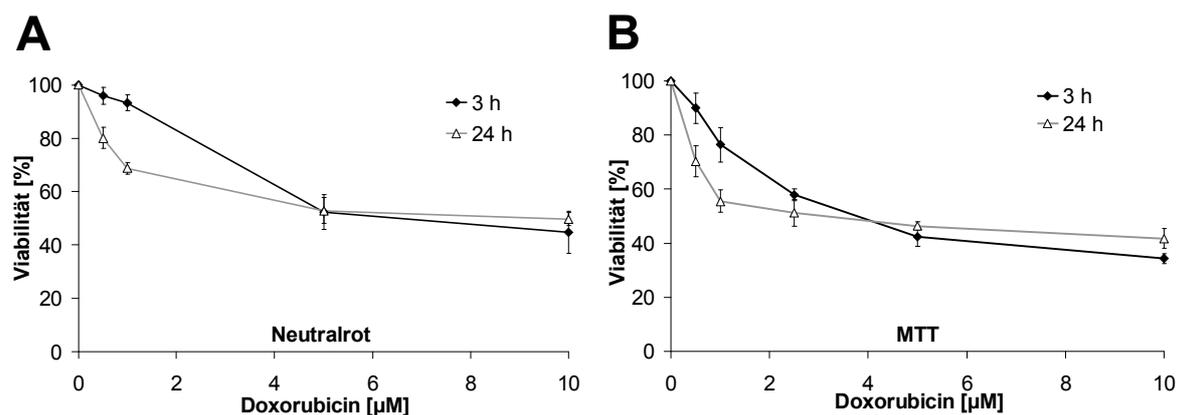


Abb.32: Doxorubicin Zytotoxizität in Hct-116 Zellen.

Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert. Die Menge an viablen Zellen wurde über einen (A) Neutralrottest oder (B) ein MTT-Assay bestimmt. Die prozentuale Menge an lebenden Zellen wurde in Bezug auf die jeweilige Kontrolle errechnet ($n=4$, $x \pm SD$).

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der Viabilitätstests im Vergleich zwischen Kurz- und Langzeit Inkubation dargestellt. Sowohl aus dem Neutralrot Test (A) als auch aus dem MTT-Assay (B) war zu erkennen, dass die Langzeit Inkubation mit niedrigen

Doxorubicin Konzentrationen eine stärkere Zytotoxizität zur Folge hatte. Bei höheren Konzentrationen unterschieden sich Lang- und Kurzzeit Inkubation jedoch nicht. In beiden Viabilitätsassays ist bei 5 und 10 μM Doxorubicin ein Plateau erreicht. Für die Kurzzeit Inkubation (3h) konnte aus dem Neutralrot Test ein EC_{50} -Wert von 5 μM , aus dem MTT-Assay von 4 μM bestimmt werden. Für die Langzeit Inkubation (24 h) ergab sich aus dem Neutralrot Test ein EC_{50} -Wert von ebenfalls 5 μM .

3.2.2 Regulation von NF- κB , AP-1, NFAT, c-Myc

Die Inkubation mit Doxorubicin für Kurz- und Langzeit führte jeweils zu einer Abnahme der viablen Zellen. Im Folgenden wurde untersucht, welche Signalwege an der Vermittlung der Doxorubicin Zytotoxizität beteiligt waren. Die direkte Wirkung von Doxorubicin auf die DNA, aber auch eine moderate Zunahme an ROS in den Zellen kann theoretisch zu einer Aktivierung des NF- κB Signalweges nach einer Inkubation mit Doxorubicin führen. Um die Rolle von NF- κB in den Doxorubicin geschädigten Hct-116 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen transient mit dem pNF- κB -SEAP Reporter transfiziert und dessen Aktivierung durch Doxorubicin bestimmt.

Abbildung 33A zeigt die Ergebnisse für das NF- κB Reporterassay. Für die Kurzzeit Inkubation konnte eine leichte, dosisabhängige, aber statistisch nicht signifikante Induktion der transkriptionellen Aktivierung von NF- κB um 40 % nach Stimulation mit 1 und 5 μM Doxorubicin detektiert werden. Bei einer Inkubation mit 10 μM dagegen wurde die transkriptionelle Aktivität von NF- κB auf ca. 60 % reprimiert. Bei einer Langzeit Inkubation der Hct-116 Zellen mit Doxorubicin zeigte sich ein anderes Bild. Hier hatte eine Inkubation mit 1 μM Doxorubicin keinen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von NF- κB . Eine Inkubation mit 5 und 10 μM führte dagegen zu einer signifikanten Repression auf 30 - 40 % der Kontrolle.

Neben der transkriptionellen Aktivierung von NF- κB wurde auch die Regulation bekannter NF- κB Target Gene untersucht. Da der Transkriptionsfaktor NF- κB verschiedene Effekte in den Zellen vermittelt, wird die Expression einer Vielzahl von Target Genen durch NF- κB reguliert (Lee *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der antiapoptotischen Faktoren XIAP und Bcl-xl, des proapoptotischen Faktors Bax und des Zinkfinger Proteins A20 überprüft.

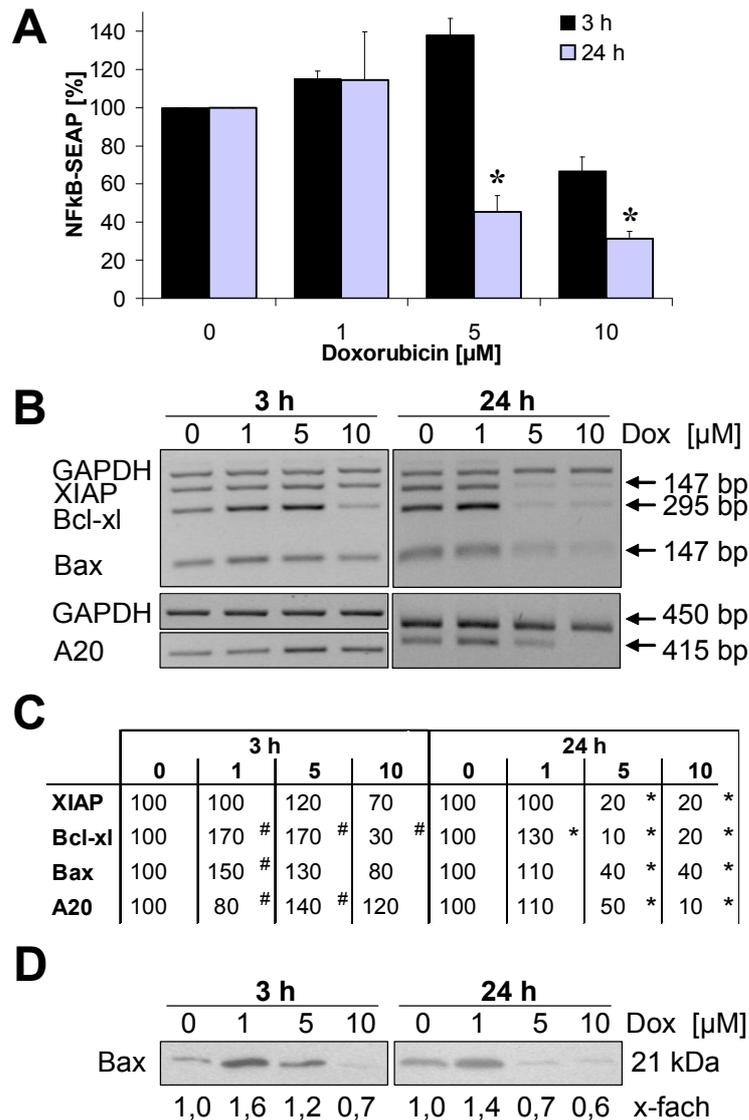


Abb.33: NF- κ B Aktivierung nach Inkubation mit Doxorubicin.

(A) Die Hct-116 Zellen wurden transient mit einem NF- κ B-SEAP-Reporterkonstrukt transfiziert und kurz oder lang mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Expression der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase im Zellüberstand bestimmt. Die SEAP-Expression ist als Prozentanteil in Bezug zur Kontrolle angegeben ($n=3$, $x \pm \text{SEM}$, $*p < 0,05$ signifikant gegen die 24 h Kontrolle, ANOVA). Nach Doxorubicin Inkubation wurde die Expression von NF- κ B abhängigen Genen mittels (B) RT-PCR ($n=3$, PCR-Bedingungen: GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; XIAP: 1' 95°C, 1' 56°C, 2' 72°C, 28 Zyklen; Bcl-xl: 1' 95°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; Bax: 1' 95°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 28 Zyklen; A20: 1' 95°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 28 Zyklen) überprüft. (C) Expression typischer NF- κ B Zielgene nach Doxorubicin Inkubation. Angegeben sind die Prozentwerte im Bezug zur jeweiligen Kontrolle ($n=3$, $*\#p < 0,05$ signifikant gegen die jeweilige Kontrolle, ANOVA) (D) Bax Expression im Western Blot ($n=3$).

Die Inkubation der Hct-116 Zellen mit Doxorubicin für Kurzzeit führte bei der Expression von XIAP zu nicht signifikanten Veränderungen auf mRNA Ebene. Nach Gabe von 5 μM Doxorubicin wurde die XIAP Expression leicht auf 120 % induziert. Die Inkubation mit 10 μM Doxorubicin resultierte in einer Repression auf 70 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb.33B+C). Das antiapoptotische Zielgen Bcl-xl und der proapoptotische Faktor Bax dagegen wurden durch 1 und 5 μM Doxorubicin

induziert. Die Induktion für Bcl-xl war signifikant und die Expression betrug nach Inkubation mit 1 und 5 μM jeweils 170 %. Bax wurde nach Stimulation mit 1 μM signifikant auf ein 150 % und nach 5 μM nicht signifikant auf 130 % induziert (Abb.33B+C). Eine Inkubation mit 10 μM führte bei beiden Zielgenen zu einer Repression im Vergleich zur Kontrolle. Die signifikant reduzierte mRNA Expression war mit 30 % bei Bcl-xl ausgeprägter als bei der nicht signifikanten Reduktion auf 80 % bei Bax. Die mRNA Menge des Zink-Finger Proteins A20 wurde durch Inkubation mit 1 μM signifikant auf 80 % reduziert. Die Stimulation mit 5 μM Doxorubicin resultierte in einer signifikanten Induktion auf 140 %. Eine nicht signifikante Induktion auf 120 % war ebenfalls nach Gabe von 10 μM zu detektieren (Abb.33C+B). Während die Expression der Zielgene nach Inkubation mit Doxorubicin für die Kurzzeit Inkubation unterschiedlich ausfiel, zeigte sich bei der Langzeit Inkubation ein einheitliches Muster. Die Inkubation mit 1 μM Doxorubicin führte bei allen 4 Zielgenen zu einer leichten Induktion der mRNA Expression, die nur für Bcl-xl mit 130 % signifikant war (Abb.33B+C). Nach einer Inkubation mit 5 oder 10 μM Doxorubicin waren alle 4 Zielgene signifikant um mindestens die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle reprimiert. Die Expression des proapoptotischen Faktors Bax wurde zusätzlich auf Protein Ebene überprüft. Für die Kurzzeit Inkubation ergab sich das gleiche Expressionsmuster wie auf mRNA Ebene. Die Inkubation mit 1 μM führte zu einer Induktion von Bax auf ein 1,6-faches. Durch Inkubation mit 5 μM konnte die Bax Proteinmenge auf ein 1,2-faches erhöht werden. Die Stimulation mit 10 μM Doxorubicin dagegen führte zu einer Abnahme der Proteinmenge auf ein 0,7-faches im Vergleich zur Kontrolle (Abb.33D). Auch bei einer Langzeit Inkubation zeigten sich Parallelen zur mRNA Expression. Durch Inkubation mit 1 μM Doxorubicin wurde der Bax Proteingehalt um ein 1,4-faches erhöht. Die Inkubation mit 5 und 10 μM führte zu der bereits auf mRNA Ebene beobachteten Repression auf ein 0,7- und 0,6-faches im Vergleich zur Kontrolle (Abb.33D).

Um fest zu stellen, ob es bei 5 und 10 μM Doxorubicin bei einer 24 h Inkubation generell zu einer Inhibierung der Transkription und Translation kommt, wurden die Hct-116 Zellen mit einem pSEAP-Control Vektor transient transfiziert, der konstitutiv SEAP exprimiert. Nach Inkubation mit Doxorubicin wurde die Menge an sezernierter alkalischer Phosphatase im Zellüberstand bestimmt. Nach Inkubation der Zellen mit 5 und 10 μM Doxorubicin konnte im Vergleich zur Kontrolle deutlich weniger SEAP im

Überstand nachzuweisen, daher war anzunehmen, dass eine deutliche Repression der Transkription und Translation vorlag (Abb.34).

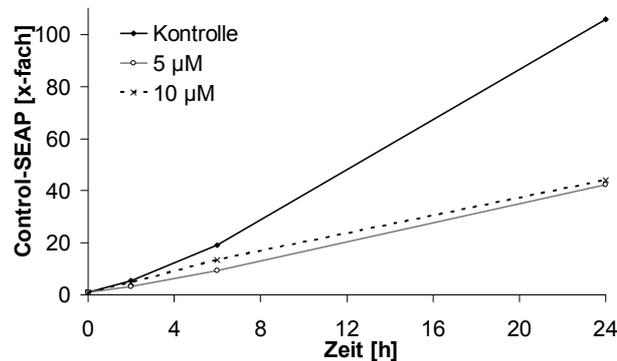


Abb.34: Bestimmung der Transkriptions-/Translationsaktivität in Hct-116 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit Doxorubicin. Die Hct-116 Zellen wurden transient mit einem konstitutiv aktiven SEAP-Reporterkonstrukt transfiziert und für 24 h mit 5 und 10 µM Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Expression der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase im Zellüberstand bestimmt. Die SEAP-Expression ist bezogen auf die SEAP-Menge im Medium am Start der Inkubation angegeben.

Obwohl in den Zytotoxizitätsassays bei 5 und 10 µM Doxorubicin keine Unterschiede in der Viabilität detektiert werden konnten, unterschieden sich also die beiden Inkubationen deutlich in der Regulation des NF-κB Signalweges. Da durch Doxorubicin eine Reihe weiterer Signalwege induziert werden können, wurden als

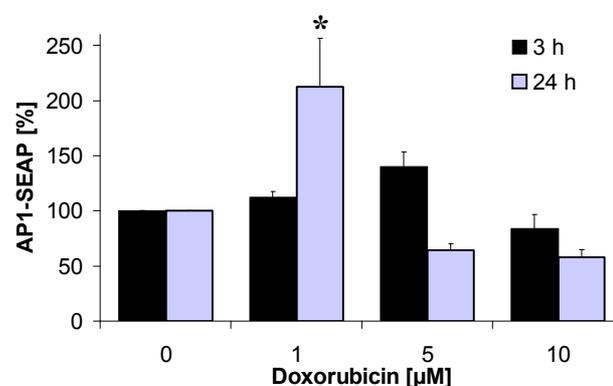


Abb.35: Aktivierung von AP-1 nach Inkubation mit Doxorubicin.

Die Hct-116 Zellen wurden transient mit einem pAP-1-SEAP-Reporterkonstrukt transfiziert und kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Expression der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase im Zellüberstand in Bezug zur Gesamtproteinmenge oder zur Menge der viablen Zellen bestimmt. Die SEAP-Expression ist als Prozentanteil in Bezug zur Kontrolle dargestellt (n=3, x±SEM, *p<0,05 signifikant gegen die 24 h Kontrolle).

Nächstes weitere Transkriptionsfaktoren nach Inkubation mit Doxorubicin betrachtet. Bei den AP-1 (*activator protein-1*) Faktoren handelt es sich um dimere Transkriptionsfaktoren, die sich aus Jun, Fos oder ATF (*activating transcription factor*) Untereinheiten zusammensetzen können (Hess *et al.*, 2004) und durch Doxorubicin aktiviert werden können (Shinoda *et al.*, 2005; Levina *et al.*, 2008). Die

transkriptionelle Aktivität von AP-1 nach Inkubation mit Doxorubicin wurde ebenfalls über ein Reporterassay gemessen.

In Abbildung 35 ist das Ergebnis der AP-1 Reporterassays dargestellt. Die Inkubation mit 1 und 5 μM für 3 h führte zu einer leichten, dosisabhängigen, aber nicht signifikanten Induktion der transkriptionellen Aktivität von AP-1 um bis zu 40 %. Die Inkubation mit 10 μM dagegen führte zu einer minimalen Repression auf ca. 90 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Langzeit Inkubation mit 1 μM Doxorubicin resultierte in einer Verdoppelung der transkriptionellen Aktivität. 5 und 10 μM Doxorubicin wiederum reprimierten die transkriptionelle Aktivität von AP-1 auf 50 %.

Ein weiterer bekannter Faktor für die Induktion von zellulärem Stress und Apoptose durch Doxorubicin ist die Störung der Kalzium Homöostase in den Zellen (Moore *et al.*, 1977). Nach einer Inkubation mit Doxorubicin kam es in Ratten Kardiomyozyten zu einer Doxorubicin abhängigen Akkumulation von ROS und Kalzium in den Mitochondrien. Die veränderte Kalzium Homöostase führte zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-Lymphocytes*) und abhängig davon zu einer Aktivierung der Fas/FasL-abhängigen Apoptose (Kalivendi *et al.*, 2005). In den Hct-116 Zellen wurde deshalb die Aktivität

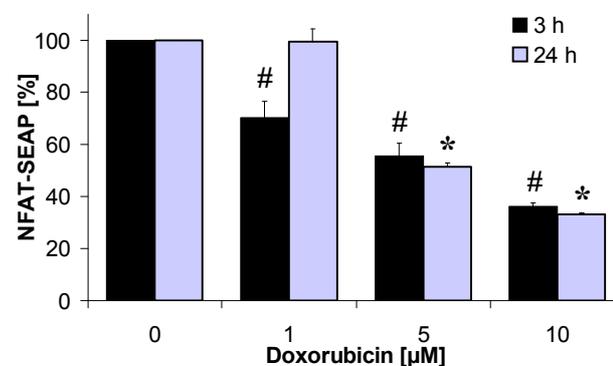


Abb.36: Aktivierung von NFAT nach Inkubation mit Doxorubicin.

Die Hct-116 Zellen wurden transient mit einem pNFAT-SEAP-Reporterkonstrukt transfiziert und kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Expression der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase im Zellüberstand in Bezug zur Gesamtproteinmenge oder zur Menge der viablen Zellen bestimmt. Die SEAP-Expression ist als Prozentanteil in Bezug zur Kontrolle dargestellt (n=4, $x \pm \text{SEM}$, #p<0,05 signifikant gegen die 3 h Kontrolle, *p<0,05 signifikant gegen die 24 h Kontrolle, ANOVA).

des NFAT Transkriptionsfaktors erneut mithilfe des SEAP-Reporterassays überprüft. Eine Inkubation der Hct-116 Zellen für Kurz- und Langzeit führte jeweils zu einer signifikanten Repression der transkriptionellen Aktivität von NFAT (Abb.36). Die Kurzzeit Inkubation löste dabei nach 1 μM Doxorubicin eine Reduktion auf 70 % der Kontrolle aus. Die Langzeit Inkubation mit 1 μM Doxorubicin hatte im Vergleich dazu keine Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität von NFAT. Die Stimulation der

Zellen mit 5 oder 10 μM Doxorubicin erbrachte sowohl bei einer Kurz- als auch bei der Langzeit Inkubation eine Repression auf ca. 60 und 40 % im Vergleich zur Kontrolle.

Der dritte Transkriptionsfaktor, der nach der Inkubation mit Doxorubicin betrachtet wurde, ist das Proto-Onkogen c-Myc, das an diversen Regulationsprozessen in den Zellen beteiligt ist (Dang, 1999). Bei einer Fehlregulation oder Überexpression erhöht c-Myc die Apoptose, die durch verschiedene Stimuli, unter anderem DNA Schäden, induziert wird (Sears und Nevins, 2002). Grassilli *et al.* (2004) konnten in Rattenfibroblasten eine Beteiligung von c-Myc an der Doxorubicin vermittelten

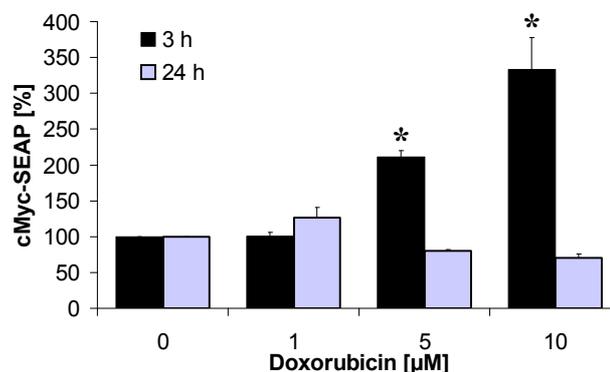


Abb.37: Aktivierung von c-Myc nach Inkubation mit Doxorubicin.

Die Hct-116 Zellen wurden transient mit einem pMyc-SEAP-Reporterkonstrukt transfiziert und kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Expression der sezernierten embryonalen alkalischen Phosphatase im Zellüberstand in Bezug zur Gesamtproteinmenge oder zur Menge der viablen Zellen bestimmt. Die SEAP-Expression ist als Prozentanteil in Bezug zur Kontrolle dargestellt ($n=3$, $x \pm \text{SEM}$, $*p < 0,05$ signifikant gegen die 3 h Kontrolle).

Apoptose nachweisen. In den Hct-116 Zellen wurde die Aktivierung von c-Myc erneut über ein SEAP-Reporterassay gemessen. Die Zellen wurden transient mit dem pMyc-SEAP Reporter transfiziert und mit Doxorubicin kurz oder lang inkubiert. Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse des Reporterassays. Die Kurzzeit Inkubation mit Doxorubicin führte in den Hct-116 Zellen zu einer dosisabhängigen, signifikanten Induktion der transkriptionellen Aktivität. Nach der Inkubation mit 5 μM war die Aktivität auf 200 %, nach 10 μM auf 350 % erhöht. Im Vergleich dazu zeigte die Langzeit Inkubation ein anderes Bild. Hier war nach einer Inkubation mit 1 μM Doxorubicin nur eine nicht signifikante Induktion auf 130 % der Kontrolle zu beobachten. Die Inkubation mit 5 und 10 μM Doxorubicin führte zu einer tendenziellen Repression auf 80 bzw. 70 %.

3.2.3 Zelltod und Apoptose

Wie in der Einleitung beschrieben, kann das Anthrazyklinderivat Doxorubicin sowohl eine zytotoxische als auch eine zytostatische Wirkung vermitteln. Um herauszufinden, ob es in den Hct-116 Zellen aufgrund der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin zu einer Induktion der Apoptose kam, wurden die Zellen kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert und die Aktivierung der Caspase-3/-7 mithilfe des APO-ONE Assays gemessen. Abbildung 38A zeigt die Ergebnisse des APO-ONE Assays. Eine Inkubation der Hct-116 Zellen mit Doxorubicin für 3 h führte zu einer dosisabhängigen signifikanten Induktion der Apoptose bis zum 4-fachen. Die 24-stündige Inkubation resultierte dagegen nur in einer signifikanten Aktivierung der Caspase-3/-7 nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin auf das 1,3-fache. Für die

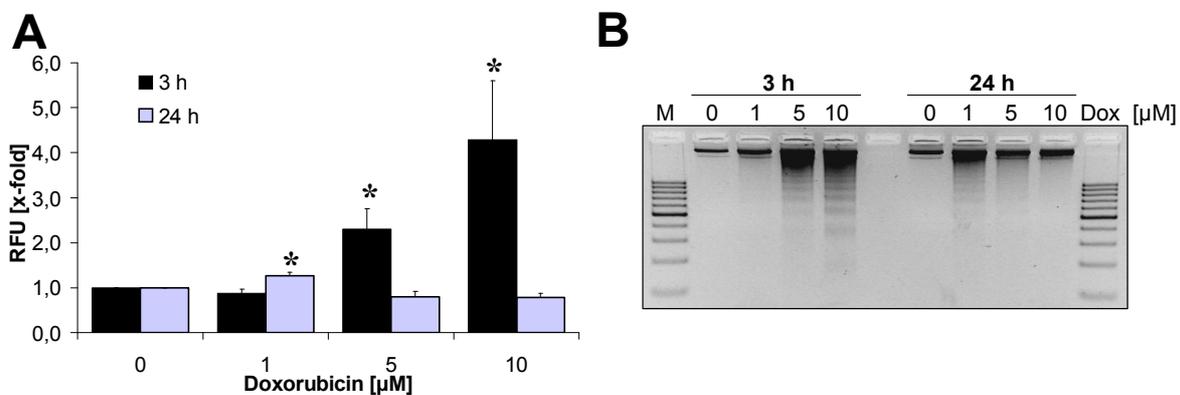


Abb.38: Apoptose Induktion nach Doxorubicin Inkubation.

Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde der Anteil an apoptotischen Zellen mithilfe des APO-ONE Assays gemessen (**A**). Der Anteil an apoptotischen Zellen ist in relativen Fluoreszenzeinheiten in Bezug zur Kontrolle angegeben ($n=4$, $x \pm \text{SEM}$, $*p < 0,05$ signifikant zur jeweiligen Kontrolle, ANOVA). Die induzierte Apoptose wurde zusätzlich über eine DNA-Fragmentationsanalyse (**B**) nachgewiesen.

höheren Konzentrationen konnte keine Induktion der Caspase-3/-7 und somit keine Apoptose nachgewiesen werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine DNA-Fragmentationsanalyse durchgeführt. Abbildung 38B zeigt, dass nach einer Inkubation mit 5 und 10 μM Doxorubicin für 3 h eine deutliche DNA-Fragmentierung zu detektieren war. Für die Langzeit Inkubation dagegen konnte auch in diesem Assay nur eine leichte DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin nachgewiesen werden. Um fest zu stellen, ob bei einer Langzeit Inkubation mit Doxorubicin eine Vermehrung von toten Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde ein Multi-Tox Fluor Assay durchgeführt. Hierbei wird unter Verwendung zweier Substrate die Aktivität von Proteasen bestimmt, die spezifisch für viable beziehungsweise tote Zellen sind. Dazu wurden die Zellen für Kurz- und Langzeit mit

Doxorubicin inkubiert und nach Ende der Inkubation wurde der Überstand mit dem Substratgemisch versetzt. Abbildung 39A bzw. 39B zeigen die Ergebnisse für das Multi-Tox Fluor Assay. Bei einer Kurzzeit Inkubation kam es zu einer signifikanten Reduktion der viablen Zellen um ca. 50 Prozent. Gleichzeitig nahm die Menge an toten Zellen signifikant dosis-abhängig zu (Abb. 39A). Bei einer Langzeit Inkubation mit Doxorubicin dagegen kam es ebenfalls zu der schon bereits im MTT-Assay und Neutralrot Test detektierten signifikanten Reduktion der viablen Zellen auf ca. 50 %. Allerdings konnte im Multi-Tox Fluor Assay nur nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin eine signifikante Induktion von toten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 39B).

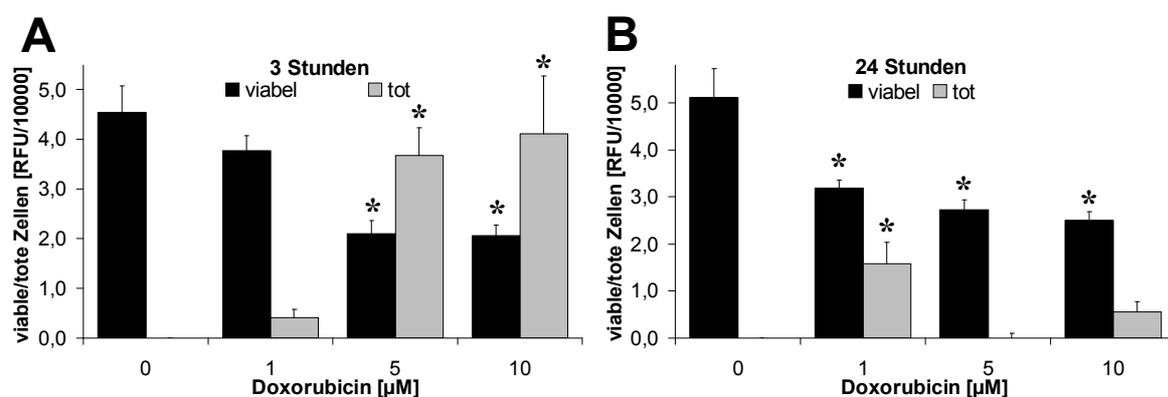


Abb.39: Anteil an toten und lebenden Zellen nach Doxorubicin Inkubation.

Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde der Anteil an lebenden und toten Zellen über den Multi-Tox Fluor Assay gemessen. **(A)** Anteil an viablen und toten Zellen nach kurzer Doxorubicin Inkubation relativ zur Kontrolle (n=4, $x \pm \text{SEM}$, * $p < 0,05$, signifikant zur jeweiligen Kontrolle, ANOVA). **(B)** Anteil an viablen und toten Zellen nach langer Doxorubicin Inkubation relativ zur Kontrolle (n=4, $x \pm \text{SEM}$, * $p < 0,05$, signifikant zur jeweiligen Kontrolle, ANOVA).

Die Messung von viablen und toten Zellen bestätigte zum einen die aus der Bestimmung der Apoptose gewonnenen Daten für die Kurzzeit Inkubation. Zum anderen wurde deutlich, dass neben der fehlenden Apoptose bei einer Langzeit Inkubation mit 5 und 10 μM Doxorubicin keine signifikante Vermehrung von toten Zellen nachweisbar war.

3.2.4 Zellmorphologie

Zusätzlich zur Bestimmung der Apoptose wurde die Morphologie der Hct-116 Zellen nach Doxorubicin Inkubation betrachtet. Da in den Kurzzeit inkubierten Hct-116 Zellen bei 5 und 10 μM eine Induktion der Apoptose und eine Zunahme der toten Zellen detektiert werden konnte, sollten sich im lichtmikroskopischen Bild tote Zellen erkennen lassen. Für die Langzeit Inkubation dagegen wurde bei 5 und 10 μM Doxorubicin vor allem die Morphologie der Zellen auf Veränderungen durch

Doxorubicin untersucht. Abbildung 40 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Hct-116 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin. Die Inkubation der Hct-116 Zellen mit 1 μM Doxorubicin für 3 h führte zu einer deutlichen Vergrößerung der Zellen und der Zellkerne im Vergleich zur Kontrolle.

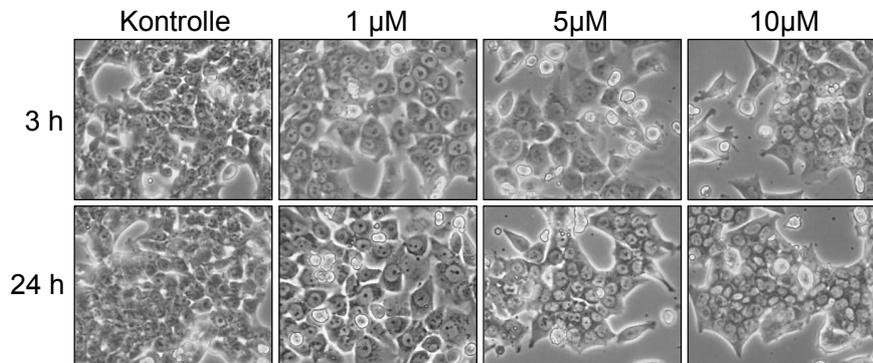


Abb.40: Morphologie der Hct-116 Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin.

Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Schädigung wurde die Morphologie der Zellen im Lichtmikroskop untersucht.

Die Behandlung der Zellen mit 5 und 10 μM Doxorubicin dagegen führte zusätzlich zu einer deutlichen Zunahme an toten, im Medium abschwimmenden Zellen. Im Vergleich dazu resultierte die Inkubation mit 1 μM Doxorubicin für 24 h ebenfalls in einer Zell- und Kernvergrößerung. Allerdings waren auch bei dieser niedrigen Konzentration schon abschwimmende, tote Zellen zu erkennen. Wurden die Hct-116 Zellen mit 5 und 10 μM für 24 h behandelt, zeigte sich ein anderes morphologisches Bild. Die Zellen erschienen kleiner und kontrastreicher und wuchsen nicht mehr konfluent sondern in einzelnen Clustern. Zusätzlich war keine Zellkernvergrößerung mehr zu erkennen (Abb.40).

Die Unterschiede in der Morphologie der Hct-116 Zellen nach der Doxorubicin Inkubation wurden zusätzlich nach Färbung mit Acridin-Orange und Hoechst-33342 betrachtet. Acridin-Orange wurde zur Detektion der lebenden Zellen verwendet. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert darauf hin grün. Zur Kernfärbung wurde Hoechst-33342 verwendet, das vorwiegend an A-T Basenpaare der DNA bindet. Abbildung 41 zeigt die Fluoreszenzbilder für die Acridin-Orange/Hoechst Färbung. Für die Kurzzeit Inkubation lässt sich bei allen Konzentrationen erneut die Vergrößerung der Zellkerne und die abnehmende Dichte der Zellen erkennen. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Zellen eine gleichmäßige Färbung mit Acridin-Orange aufwiesen. Die Langzeit Inkubation zeigte ebenfalls die Vergrößerung der Kerne nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin und eine gleichmäßige Färbung mit Acridin-Orange. Die Inkubation mit 5 und 10 μM führte

dazu, dass die Zellkerne kleiner waren und weniger gleichmäßig, sondern eher punktuell mit Hoechst angefärbt wurden.

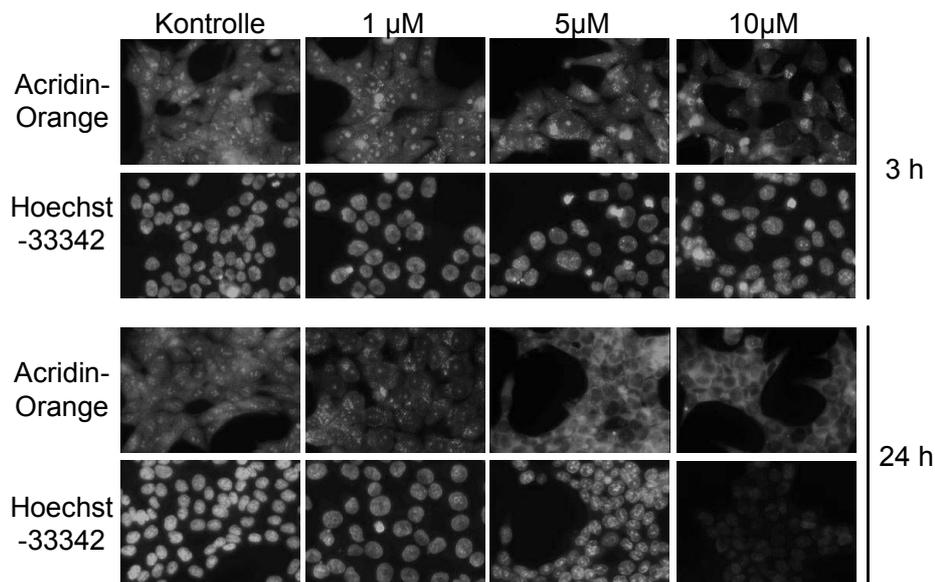


Abb.41: Acridin-Orange/Hoechst Färbung nach Inkubation mit Doxorubicin.

Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Schädigung wurden die Zellen mit Acridin-Orange und Hoechst-33342 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch (200x) untersucht.

Nach einer Inkubation mit 10 µM Doxorubicin konnten durch die Hoechst Färbung die Kerne nur noch schwach detektiert werden. Die Acridin-Orange Färbung zeigte ebenfalls keine gleichmäßige Färbung der Zellen mehr. Nach 5 und 10 µM Doxorubicin Inkubation konnte mithilfe des Acridin-Orange keine Kernfärbung mehr erzielt werden.

3.2.5 Zellzyklus

Obwohl die Doxorubicin Inkubation der Hct-116 Zellen zu einer deutlichen Zytotoxizität bei Kurz- und Langzeit Inkubation führte, konnte bei der Langzeit Inkubation bei 5 und 10 µM Doxorubicin keine Aktivierung der Caspase-3/-7 und keine Zunahme an toten Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnten Veränderungen in der Morphologie der Zellen im Vergleich zwischen der Kurz- und Langzeit Inkubation aufgezeigt werden. Da Doxorubicin neben den zytotoxischen auch zytostatische Eigenschaften besitzt, wurde die Vermutung aufgestellt, dass es in den Hct-116 Zellen bei Langzeit Inkubation mit Doxorubicin zu einem Eingriff in den Zellzyklus und damit zu einem Arrest kam. Das fehlerfreie Fortschreiten des Zellzyklus wird durch verschiedene Moleküle kontrolliert. Im Folgenden wurden die Expression und die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 und die Expression

von p21, einem Zielgen von p53, untersucht. Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit Doxorubicin inkubiert und die Expression auf mRNA und Protein Ebene überprüft.

Abbildung 42A zeigt die Ergebnisse für die p53 und p21 RT-PCR. Bei einer Kurzzeit Inkubation mit Doxorubicin kam es mit 1 μM zu einer 4,5-fachen und mit 5 μM zu einer 7,1-fachen Induktion der p21 Expression. Die Expression von p53 wurde auf RNA Ebene mit steigender Dosis geringfügig induziert. Bei einer Langzeit Inkubation dagegen war auf mRNA Ebene eine Induktion von p21 nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin auf ein 8-faches nachzuweisen (Abb.42A). 5 und 10 μM führten zu einer Repression der p21 Expression auf ein 0,5-faches bzw. 0,3-faches der Kontrolle. Die p53 mRNA Expression zeigte nur minimale Veränderungen.

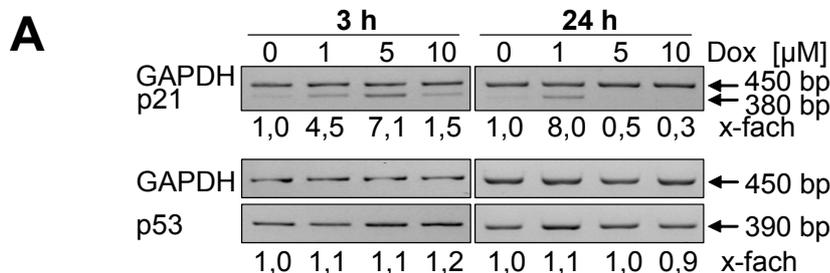


Abb.42A: Expression von p21 und p53 nach Doxorubicin Inkubation.

Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Expression von p53 und seinem Target p21 mittels RT-PCR untersucht (n=3, PCR Bedingungen: p53: 1' 95°C, 1' 60°C, 2' 72°C; p21: 1' 95°C, 1' 58°C, 2' 72°C, 26 Zyklen, 17 Zyklen, GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen).

In Abbildung 42B sind Western Blot Ergebnisse für die p53 und p21 Protein Expression dargestellt. Die p53 Proteinmenge wurde durch beide Inkubationen deutlich induziert. Die Western Blot Ergebnisse zeigen eine Zunahme der p53 Proteinmenge nach Kurzzeit Inkubation mit 1 μM Doxorubicin. Bei Inkubation mit 5 μM erreichte die Proteinmenge ein Maximum und nahm bei 10 μM wieder etwas ab, ist jedoch gegenüber der Kontrolle immer noch deutlich erhöht. Für die Langzeit

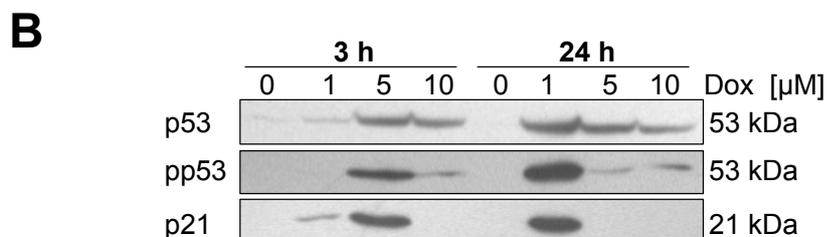


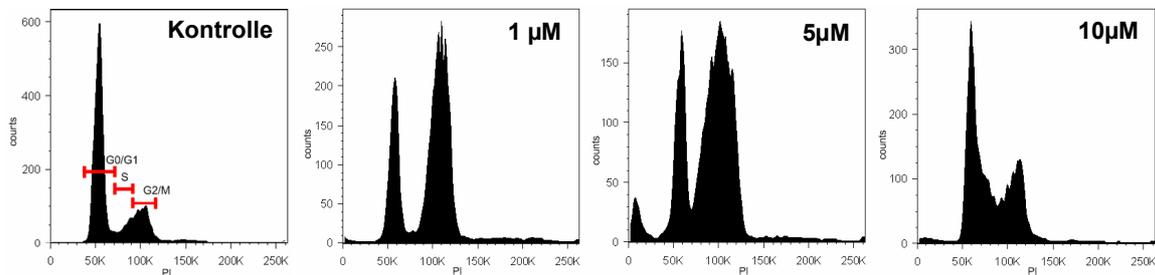
Abb.42B: Expression von p53, p53 Phosphorylierung und p21 Induktion nach Doxorubicin Inkubation. Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin inkubiert. Neben der Expression beider Proteine wurde im Western Blot (n=3) zusätzlich die Phosphorylierung von p53 (Ser392) ermittelt.

Inkubation zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier war das p53 Maximum allerdings schon nach Inkubation mit 1 μM Doxorubicin erreicht und mit höheren Konzentrationen nahm die p53 Proteinmenge wieder etwas ab (Abb. 42B). Die Regulation des p53 erfolgt in der Regel posttranskriptionell über eine Stabilisierung des Proteins (Jimenez *et al.*, 1999). Eine Phosphorylierung von p53 an der Stelle Serin392 führt zu einer Tetramerisierung und Stabilisierung der p53 Proteine und damit zu einer besseren DNA-Bindungskapazität und transkriptionellen Aktivität (Sakaguchi *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung von p53 an Serin 392 wurde ebenfalls nach Inkubation mit Doxorubicin überprüft. Die Kurzzeit Inkubation mit 5 μM und die Langzeit Inkubation mit 1 μM Doxorubicin führten zu einer starken Zunahme der p53 Phosphorylierung. Für die Kurzzeit Inkubation war bei Behandlung mit 10 μM ebenfalls eine leichte Phosphorylierung zu erkennen. Das gleiche galt für die Langzeit Inkubation mit 5 und 10 μM Doxorubicin (Abb.42B). Die Expression von p21 dem Zielmolekül von p53 wurde ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Wie auf mRNA Ebene konnte die stärkste Expression des p21 Proteins nach Kurzzeit Inkubation mit 5 μM und Langzeit Inkubation mit 1 μM Doxorubicin nachgewiesen werden. Für die Kurzzeit Inkubation war zusätzlich eine leichte Zunahme an p21 bei einer Inkubation mit 1 μM Doxorubicin zu erkennen (Abb.42B).

Da Doxorubicin mit p53 und p21 zwei an der Zellzyklus Regulation beteiligte Faktoren beeinflusste, wurde als Nächstes der Anteil der Hct-116 Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus untersucht. Der Zellzyklus ist in 2 Phasen unterteilt. Die Interphase und die Mitosephase (M-Phase). Die Interphase wiederum ist in drei Abschnitte gegliedert: G1, S, G2 und umfasst das Zellwachstum, die DNA Synthese und alle weiteren Schritte zur Vorbereitung auf die Zellteilung. In der M-Phase finden die eigentliche Mitose und die Zytokinese statt (Gillett und Barnes 1998). Der DNA-Gehalt der Hct-116 Zellen wurde nach der Doxorubicin Inkubation über eine Färbung mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid in einem Durchflusszytometer gemessen. Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse für die Zellzyklus Analyse. Beide Kontrollen besaßen die charakteristische Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen. Der erste Peak entspricht den Zellen in G0/G1 mit einfachem Chromosomensatz (2n). Der zweite Peak steht für die Zellen, die bereits einen doppelten Chromosomensatz besitzen (4n) und sich in der G2/M-Phase befinden. Zwischen den beiden Peaks liegen alle Zellen der S-Phase, in der der Chromosomensatz verdoppelt wird. Die

Gabe von 1 μM Doxorubicin führte sowohl nach Kurzzeit als auch nach Langzeit Inkubation zu einem deutlichen Arrest der Zellen in der G2/M-Phase. Eine Inkubation mit 5 μM Doxorubicin für Kurzzeit verstärkte diesen Effekt noch zusätzlich.

3 h Doxorubicin



24 h Doxorubicin

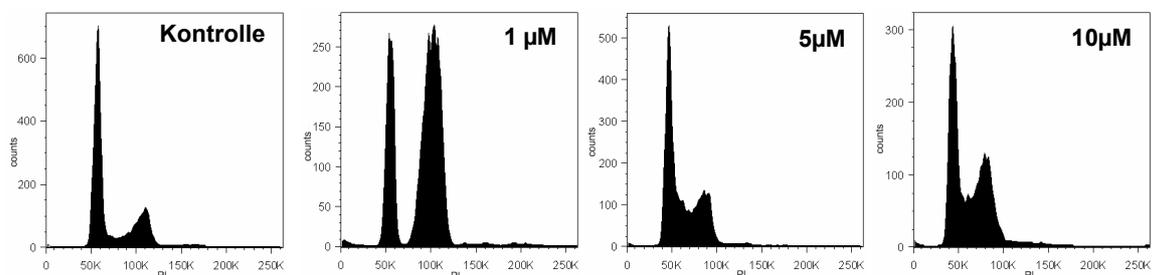


Abb.43: Zellzyklus Analyse nach Doxorubicin Inkubation.

Die Hct-116 Zellen wurden kurz oder lang mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der DNA-Gehalt im Durchflusszytometer bestimmt (n=2).

Die meisten Zellen waren in der G2/M-Phase, ein kleinerer Teil in der G0/G1-Phase und es konnten zusätzlich apoptotische Zellen in Form eines sub G1/G0 Peaks nachgewiesen werden. Die Langzeit Inkubation mit 5 μM Doxorubicin dagegen zeigte bei der Zellzyklusanalyse ein komplett anderes Bild. Hier waren fast keine Zellen mehr in der G2/M-Phase zu detektieren. Die meisten Zellen konnten der G0/G1 oder der S-Phase zugeordnet werden. Bei Kurzzeit und Langzeit Inkubation mit 10 μM Doxorubicin ergab sich ein ähnliches Bild. Auch hier waren ein Teil der Zellen in der G0/G1-Phase und ein Teil in der S-Phase. Nur ein geringer Teil der Zellen konnte der G2/M-Phase zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der Zellzyklus Analyse zeigten deutlich, dass die Behandlung mit Doxorubicin zu einem Zellzyklus Arrest in der G2/M-Phase führte. Lediglich die Langzeit Inkubation der Zellen mit 5 und 10 μM führte zu keinem G2/M Arrest, sondern der Großteil der Zellen befand sich in der G0/G1- und der S-Phase.

3.3 Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Wirkung

Eine Reihe der durch Doxorubicin regulierten Signalwege wurde im Vergleich zwischen Lang- und Kurzzeit Inkubation bereits betrachtet. Ein weiterer Signalweg, der durch Doxorubicin reguliert werden kann, ist der als Proliferationsweg bekannte PI3K/AKT Signalweg. Durch die Aktivierung von PI3K/AKT kommt es zur Modulation zahlreicher nachgeschalteter Proteine und Zielgene (Manning und Cantley, 2007). Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Inkubation mit Doxorubicin in den Zellen zu einer Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges führen kann. Die Zellen waren durch diese Aktivierung gegen die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin geschützt. Eine Inhibierung des PI3K/AKT Signalweges dagegen erhöhte die Sensitivität der Zellen gegen die Inkubation mit Doxorubicin (Li *et al.*, 2007a; Yu *et al.*, 2008; Alexia *et al.*, 2006). Zu den durch den PI3K/AKT Signalweg regulierten Molekülen gehören auch die forkhead Faktoren der Klasse O (FOXO). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Proliferation, des Zell Zyklus, der DNA Reparatur, des Redox-Status und der Apoptose beteiligt sind (Huang *et al.*, 2007). Ein Mitglied der Klasse O der forkhead Faktoren ist FOXO4 (Katoh und Katoh, 2004). Aus der Literatur war bekannt, dass eine Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges zu einer Phosphorylierung und Inaktivierung von FOXO4 führt (Matsuzaki *et al.*, 2005a). Weiterhin kann die transkriptionelle Aktivität von FOXO4 durch eine ROS-induzierte JNK-abhängige Phosphorylierung zusätzlich aktiviert werden (Essers *et al.*, 2004). Im Folgenden sollte die Rolle des FOXO4 Transkriptionsfaktors in der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität untersucht werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges durch Doxorubicin in einer Inhibierung von FOXO4 resultiert. Eine Hemmung dieses Signalweges sollte die Hct-116 Zellen gegen die Doxorubicin Zytotoxizität zusätzlich sensitivieren.

3.3.1 Doxorubicin vermittelte Apoptose

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Hct-116 Zellen nach dem Kurzzeitschema mit Doxorubicin inkubiert, da mit dieser Inkubation eine dosisabhängige Zunahme der Zytotoxizität und Apoptose zu erreichen war (siehe Abbildung 38). Die durch Doxorubicin induzierte Apoptose wurde zunächst durch Messung verschiedener Caspase Aktivitäten charakterisiert. Abbildung 44A zeigt eine signifikante, dosis-abhängige 17-fache Aktivierung der

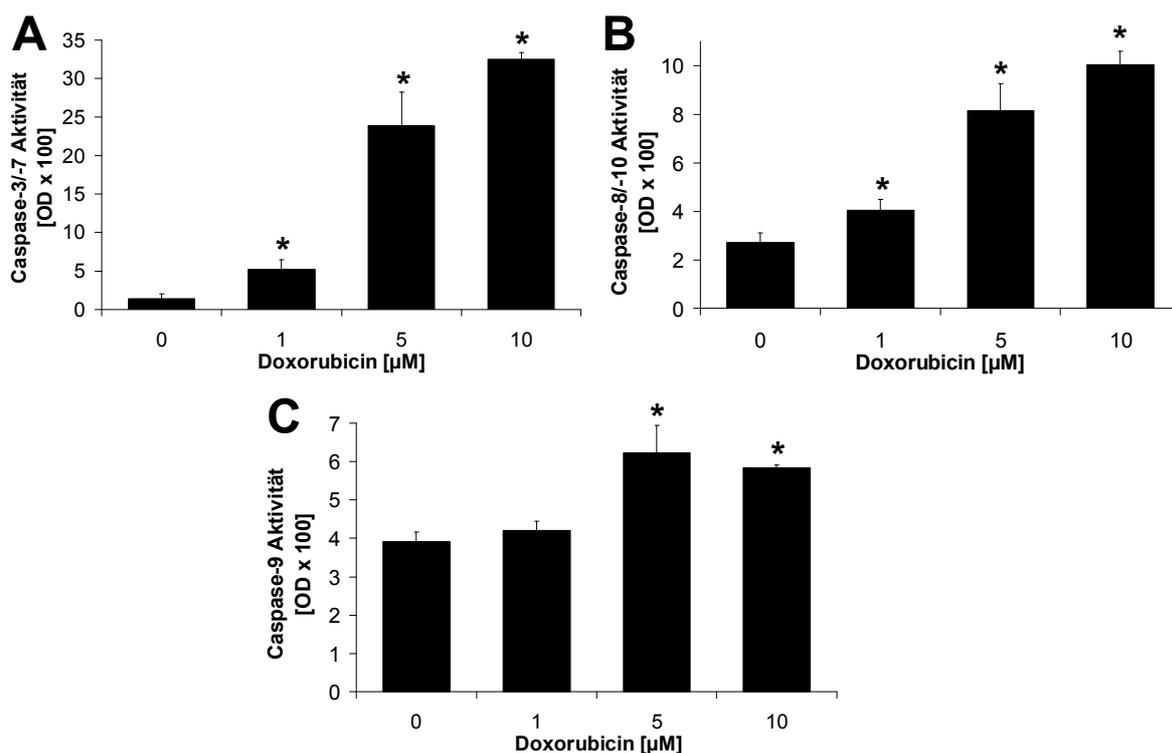


Abb.44: Caspase Aktivierung nach 3 h Inkubation mit Doxorubicin.

Die Hct-116 Zellen wurden für 3 h mit Doxorubicin inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen für 24 h in Wachstumsmedium gehalten. Die Caspase Aktivität wurde pro 50 µg Protein bestimmt und es sind die gemessenen OD-Werte x 100 angegeben. **(A)** Caspase-3/7 Aktivierung (n=3, x±SD, *p<0,05 signifikant gegen die Kontrolle, ANOVA), **(B)** Caspase-8/10 Aktivierung (n=3, x±SD, *p<0,05 signifikant gegen die Kontrolle, ANOVA), **(C)** Caspase-9 Aktivierung (n=3, x±SD, *p<0,05 signifikant gegen die Kontrolle, ANOVA).

Effektorcaspase-3/-7 und bestätigt noch einmal die vorherigen Ergebnisse. Zusätzlich wurde die Aktivierung der Initiatorcaspasen-8/-10 und -9 bestimmt. Die Caspasen-8/-10, die rezeptorvermittelt aktiviert werden, zeigten ebenfalls eine signifikant dosisabhängige Aktivierung um ein 4-faches (Abb.44B). Die Induktion der Caspase-9, die über den mitochondrialen Weg aktiviert wird, wurde signifikant 1,5-fach erhöht (Abb.44C).

3.3.2 FOXO4 Überexpression, Apoptose und Zellzyklus

Die Regulation und Rolle von FOXO4 in der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität in den Hct-116 Zellen wurde in den folgenden Versuchen mithilfe verschiedener FOXO4 Expressionskonstrukte untersucht. Da es sich bei FOXO4 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der auch an der Regulation der Proliferation (Medema *et al.*, 2000) und Apoptose (Tang *et al.*, 2002; Urbich *et al.*, 2005) beteiligt ist, wurde zunächst für alle transfizierten Zellen eine Charakterisierung vorgenommen. Für die Überexpression von FOXO4 wurden 4 verschiedene Konstrukte verwendet. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die verwendeten

Vektoren. Die Regulation von FOXO4 erfolgt über den JNK Signalweg und den

Tabelle 3: FOXO4 Expressionskonstrukte

Konstrukt	Eigenschaft
FOXO4JNK-mut	FOXO4 Expressionsvektor, JNK Phosphorylierungsstellen geblockt
FOXO4wt(1)	FOXO4 Wildtyp Expressionsvektor (gleicher backbone Vektor wie FOXO4JNK-mut)
FOXO4nukleär	FOXO4 Expressionsvektor, AKT Phosphorylierungsstellen geblockt
FOXO4wt(2)	FOXO4 Wildtyp Expressionsvektor (gleicher backbone Vektor wie FOXO4nukleär)

PI3K/AKT Weg. Um den Einfluss dieser Regulation bei einer Inkubation mit Doxorubicin zu untersuchen, wurde zum einen ein FOXO4 Konstrukt verwendet, bei dem durch Basenaustausch von Threonin zu Alanin eine Phosphorylierung durch die JNK nicht mehr möglich ist (FOXO4JNK-mut). Mit dem zugehörigen FOXO4wt(1) Vektor konnte Wildtyp FOXO4 in den Hct-116 Zellen überexprimiert werden (zur Verfügung gestellt von Prof. Burgering, University Medical Center Utrecht, Niederlande; Essers *et al.*, 2004).

Zum anderen wurde der FOXO4nukleär Vektor verwendet. Auch hier sind durch einen Basenaustausch von Serin bzw. Threonin zu Alanin alle drei AKT Phosphorylierungsstellen mutiert, sodass das exprimierte FOXO4 nicht mehr inaktiviert und aus dem Kern austransportiert werden kann. Es liegt konstitutiv aktiv im Zellkern vor. FOXO4wt(2) diente wiederum zur Expression von FOXO4 Wildtyp in den Zellen (zur Verfügung gestellt von Prof. Kikkawa, Biosignal Research Center, Kobe University, Japan; Matsuzaki *et al.*, 2005a). Zur Charakterisierung der Wirkung der verschiedenen FOXO4 Expressionskonstrukte auf die Hct-116 Zellen wurden diese transient mit den jeweiligen Vektoren transfiziert und die Proliferation, der Zellzyklus und die basale Induktion der Apoptose betrachtet. Die Ergebnisse für die beiden FOXO4wt Konstrukte sind jeweils zusammengefasst.

Tabelle 4: Wachstumskurve der Hct-116 Zellen nach Transfektion mit FOXO4

	Zeit [h]				
	24	48	72	96	144
Hct-116wt	0,062 ± 0,001	0,112 ± 0,006	0,175 ± 0,005	0,262 ± 0,010	0,621 ± 0,054
Hct-116leerer Vektor	0,075 ± 0,003	0,144 ± 0,003	0,199 ± 0,007	0,235 ± 0,012	0,692 ± 0,036
Hct-116FOXO4wt	0,075 ± 0,002	0,124 ± 0,001	0,179 ± 0,005	0,253 ± 0,004	0,672 ± 0,022
Hct-116FOXO4nukleär	0,078 ± 0,002	0,126 ± 0,002	0,190 ± 0,001	0,249 ± 0,005	0,679 ± 0,016
Hct-116FOXO4JNK-mut	0,075 ± 0,004	0,128 ± 0,007	0,185 ± 0,007	0,244 ± 0,013	0,628 ± 0,074

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Wachstumskurve. Die mit den einzelnen FOXO4 Expressionsvektoren transfizierten Hct-116 Zellen unterschieden sich in ihrem Wachstum weder untereinander, noch im Vergleich zu den nicht transfizierten Hct-116wt Zellen. Um zu verdeutlichen, dass die Proliferation der Zellen durch die

Überexpression von FOXO4 nicht beeinflusst war, wurde zusätzlich über eine durchflusszytometrische Analyse der DNA Gehalt der Zellen und somit der Anteil in den verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt. Tabelle 5 zeigt den prozentualen Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen.

Tabelle 5: Zellzyklus Analyse der Hct-116 Zellen nach Transfektion

	[%] Zellen in			
	sub G1/G0	G1/G0	S	G2/M
Hct-116wt	1,65 ± 0,10	58,77 ± 0,33	15,10 ± 1,24	24,48 ± 1,48
Hct-116 mock Transfiziert	1,82 ± 0,55	60,53 ± 1,00	10,71 ± 2,01	26,49 ± 0,46
Hct-116FOXO4wt	3,80 ± 0,69	57,01 ± 3,02	13,18 ± 4,81	26,01 ± 1,11
Hct-116FOXO4nukleär	3,60 ± 0,31	57,21 ± 3,09	17,95 ± 0,32	21,25 ± 3,72
Hct-116FOXO4JNK-mut	3,02 ± 0,74	57,88 ± 0,22	12,00 ± 0,83	27,09 ± 0,29

Die mit den verschiedenen FOXO4 Konstrukten transfizierten Hct-116 Zellen unterschieden sich nur marginal in ihrer Verteilung auf die einzelnen Phasen. 60 % der Zellen befanden sich bei allen Transfektionen in der G1/G0-Phase, 12 - 17 % in der S- und ca. 25 % in der G2/M-Phase. Neben der tabellarischen Darstellung in Tabelle 5 wurden in Abbildung 45A zusätzlich die Histogramme der einzelnen Messungen übereinandergelegt und es war deutlich zu erkennen, dass auch hier

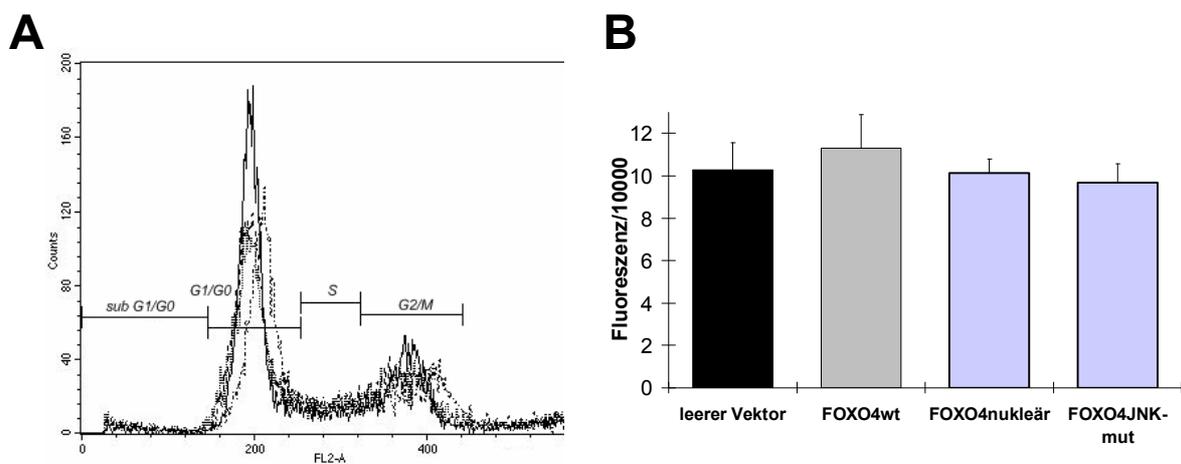


Abb.45: Apoptose/Proliferation der Hct-116 FOXO4 Zellklone.

Die Hct-116 Zellen wurden transient mit den verschiedenen FOXO4 Konstrukten transfiziert. (A) 72 h nach der Transfektion wurde der Zellzyklus über eine Propidiumiodid Färbung und (B) die Apoptose mittels APO-ONE Assay bestimmt (n=3, x±SEM).

keine Abweichung aus den einzelnen Zellzyklusphasen vorlag. Aus der FACS-Analyse konnte außerdem entnommen werden, dass auch der Anteil der Zellen in der sub G0/G1 Phase, die auf eine Apoptose hinweist, nur zwischen 2 - 4 % lag (Tabelle 5). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde die basale Apoptoserate zusätzlich über die Bestimmung der Caspase-3/-7 Aktivität gemessen (APO-ONE Assay). Abbildung 47B zeigt, dass sich die mit FOXO4 transfizierten Hct-116 Zellen in der Apoptoserate nicht von Zellen, die mit einem leeren Vektor

transfiziert wurden, unterschieden. Aus dieser Charakterisierung wurde deutlich, dass in den Hct-116 Zellen eine Überexpression von FOXO4 keinen Einfluss auf die basale Proliferation oder Apoptose hatte.

3.3.3 FOXO4 und JNK

Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor FOXO4 besitzt zwei JNK-abhängige Phosphorylierungsstellen (Threonin 447, Threonin 451). Bei der JNK handelt es sich um eine Kinase die durch oxidativen Stress in den Zellen phosphoryliert und aktiviert wird. Im Zuge dieser Aktivierung kann die JNK dann ihr Zielgen FOXO4 phosphorylieren, was zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivierung von FOXO4 führt (Essers *et al.*, 2004). Da Doxorubicin in den Hct-116 Zellen oxidativen Stress induziert wurde als Nächstes die Aktivierung der JNK nach Doxorubicin Stimulus

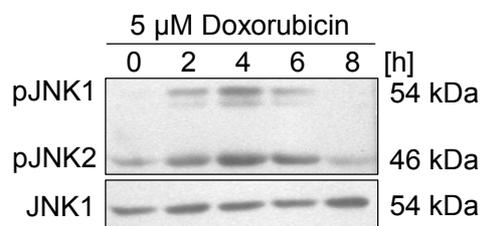


Abb.46: Doxorubicin und Phosphorylierung der JNK.

Die Hct-116 Zellen wurden mit 5 μM Doxorubicin für 3 h und Wachstumsmedium für 5 h inkubiert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen und die Phosphorylierung der JNK im Western Blot (n=3) überprüft.

getestet. Die Hct-116 Zellen wurden mit 5 μM Doxorubicin inkubiert und die Phosphorylierung der JNK wurde für die ersten 8 h im Western Blot überprüft. Die Doxorubicin Inkubation führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der JNK mit einem Maximum nach 4 Stunden (Abb.46). Um die Rolle des FOXO4 Transkriptionsfaktors bei diesem Prozess und dessen Wirkung auf die Doxorubicin Zytotoxizität zu untersuchen, wurden Hct-116 Zellen transient mit FOXO4wt(1) und FOXO4JNK-mut transfiziert. Die Überexpression von Wildtyp FOXO4 in den Hct-116 Zellen sensitivierte die Zellen gegen den Doxorubicin Stimulus (Abb.47A). Für die Hct-116wt Zellen lag der EC₅₀-Wert bei 5 μM. Eine transiente Transfektion mit Wildtyp FOXO4 führte zu einem EC₅₀-Wert von ca. 3 μM. Durch Überexpression des FOXO4JNK-mut sollte der Einfluss des JNK/FOXO4 Signalweges auf die Doxorubicin Zytotoxizität bestimmt werden. Die beiden JNK Phosphorylierungsstellen sind bei diesem FOXO4 geblockt, sodass keine zusätzliche transkriptionelle Aktivierung von FOXO4 durch die JNK mehr erfolgen kann. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese fehlende transkriptionelle Aktivierung die Hct-116 Zellen

gegen die durch FOXO4 induzierte stärkere Zytotoxizität schützen sollte. 72 h nach der transienten Transfektion wurden die Hct-116 Zellen erneut mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin inkubiert und die Viabilität über ein MTT-Assay

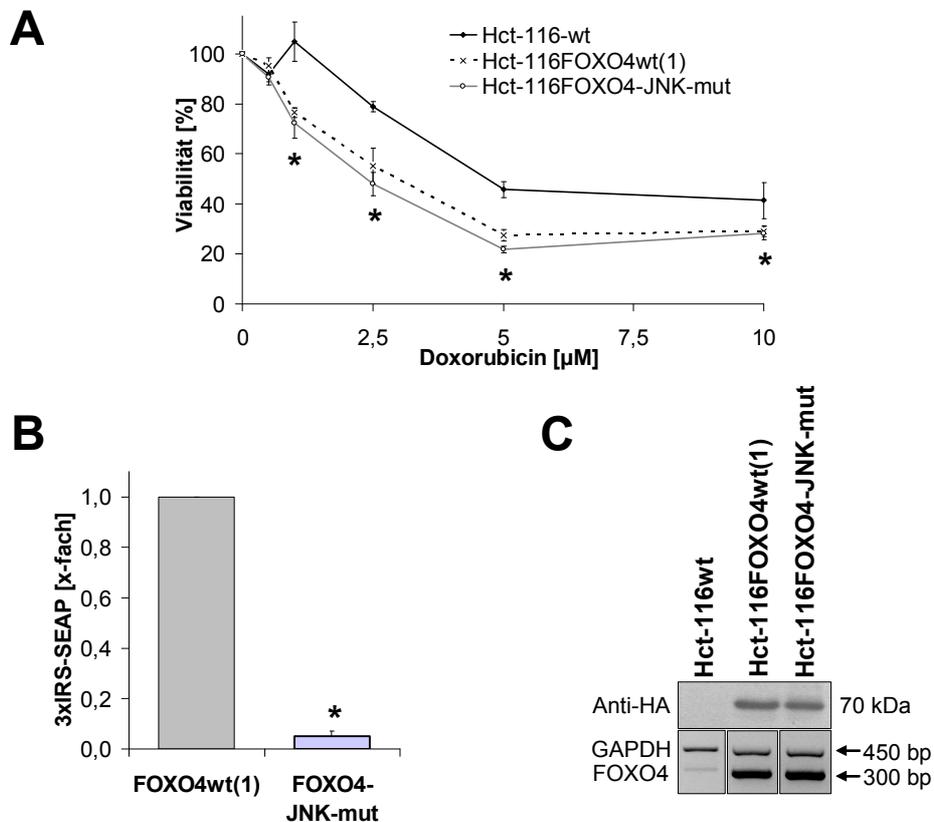


Abb.47: Doxorubicin und JNK-abhängige Phosphorylierung von FOXO4.

72 h nach der transienten Transfektion mit FOXO4wt(1) oder FOXO4JNK-mut wurden die Hct-116 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin für 3 h inkubiert. Nach 24 stündiger Nachinkubation in Wachstumsmedium wurde **(A)** die Viabilität der Hct-116 Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Die Viabilität ist als prozentualer Anteil zur jeweiligen Kontrolle dargestellt (n=4, $x \pm SD$, * $p < 0,05$ signifikant zu den Hct-116wt Zellen, ANOVA). Die FOXO4 Überexpression wurde **(B)** im SEAP-Assay nach Ko-Transfektion mit dem 3xIRS-SEAP Reporter (n=3, $x \pm SD$, * $p < 0,05$ signifikant zu FOXO4wt(1), ANOVA) und **(C)** mittels Western Blot gegen das HA-Tag von FOXO4 und mittels RT-PCR (PCR Bedingungen: GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; FOXO4: 1' 95°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 29 Zyklen) überprüft.

bestimmt. Entgegen den Erwartungen hatte die Blockade der JNK-abhängigen Phosphorylierungsstellen keinen Einfluss auf die durch FOXO4 erhöhte Zytotoxizität. Im Vergleich zu den Hct-116FOXO4wt(1) Zellen zeigte sich in den Hct-116JNK-mut Zellen die gleiche Doxorubicin abhängige Zytotoxizität und ein EC_{50} -Wert von ca. 3 μM (Abb.47A).

Die Funktionalität der beiden FOXO4 Konstrukte wurde in einem Reporterassay getestet. Für das Reporterassay wurden die Zellen mit dem jeweiligen FOXO4 Konstrukt und dem 3xIRS-SEAP Reporter ko-transfiziert. Aus Abbildung 47B geht hervor, dass die Hct-116FOXO4JNK-mut Zellen eine signifikant geringere

transkriptionelle Aktivität besaßen als die Hct-116FOXOwt(1) Zellen. Die Überexpression von FOXO4 wurde zusätzlich im Western Blot mit einem Antikörper gegen das HA-Tag von FOXO4 und mittels RT-PCR überprüft. In Abbildung 47C ist sowohl im Western Blot als auch nach RT-PCR deutlich die Überexpression von FOXO4 zu erkennen.

Zusätzlich zur Überexpression und Funktionalität wurde der Einfluss von FOXO4 auf die Aktivierung des Selenoprotein P Promotors untersucht. Dazu wurden die Zellen erneut mit den FOXO4 Konstrukten und einem Luziferase Reportervektor, der den Promotor der Selenoproteine trägt, transient ko-transfiziert (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Klotz, Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf, Deutschland; Mostert *et al.*, 2001). 72 h nach der Transfektion wurde die

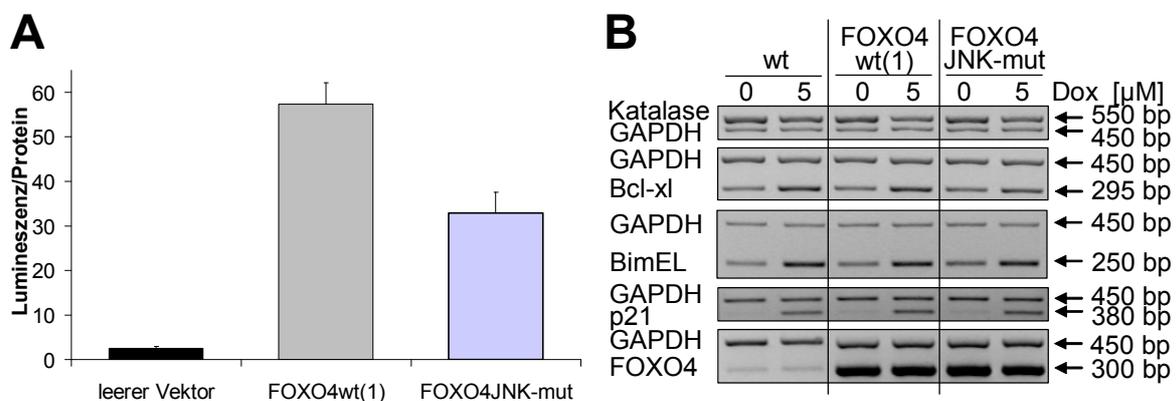


Abb.48: Doxorubicin und FOXO4-abhängige Targetgene.

72 h nach der transienten Transfektion mit FOXO4wt(1) oder FOXO4JNK-mut wurde die Expression von bekannten FOXO4 Targetgenen untersucht. **(A)** Die Zellen wurden mit einem pSE-Luc Reporter ko-transfiziert und die Reporteraktivität wurde mittels Luziferase Assay bestimmt (n=4, x±SEM). **(B)** Zusätzlich wurde die Expression einiger Zielgene auf mRNA Ebene bestimmt (n=3, PCR Bedingungen: Bcl-xl: 1' 95°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; BimEL: 1' 95°C, 1' 58°C, 2' 72°C, 28 Zyklen; FOXO4: 1' 95°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 29 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; Katalase: 1' 95°C, 1' 54°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; p21: 1' 95°C, 1' 58°C, 2' 72°C, 17 Zyklen).

Luziferasemenge in den Zellen gemessen. Die FOXO4wt(1) Überexpression führte zu einer deutlichen Aktivierung des Luziferase Reporters. Die Transfektion mit FOXO4JNK-mut dagegen resultierte in einer geringeren Luziferase Expression als bei den Hct-116FOXO4wt(1) Zellen (Abb.48A). Für weitere vermutete FOXO4 Zielgene wurde die Expression der mRNA nach transienter Transfektion und Inkubation mit 5 µM Doxorubicin untersucht. Abbildung 48B zeigt, dass alle untersuchten Zielgene ihre Expression nach transienter Transfektion mit den beiden FOXO4 Expressionskonstrukten gegenüber den Hct-116wt Zellen nicht veränderten. Die Inkubation mit 5 µM Doxorubicin erzeugte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Hct-116wt und FOXO4 überexprimierenden Zellen.

3.3.4 FOXO4 und PI3K/AKT

Neben der Regulation über den JNK Signalweg wird die zelluläre Lokalisation von FOXO4 zusätzlich über den PI3K/AKT Signalweg reguliert. Dieser onkogene Signalweg ist verbunden mit dem Überleben der Zellen und der Proliferation (Testa und Bellacosa, 2001). Nach der Aktivierung dieses Signalweges kommt es zu einer Aktivierung der AKT Kinase, welche dann eine Vielzahl von Molekülen phosphorylieren und diese entweder aktivieren oder inhibieren kann. FOXO4 besitzt drei negativ regulierte, AKT abhängige Phosphorylierungsstellen (Threonin 28, Serin 193, Serin 258). Kommt es zu einer Aktivierung der AKT, wird FOXO4 an diesen Stellen phosphoryliert und es kommt zu einem Austransport von FOXO4 aus dem Kern und somit zu einer Inaktivierung (Matsuzaki *et al.*, 2005a). Aus der Literatur war bereits für verschiedene Mamma-Karzinomzellen (Tari *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005) und für Lungen Adeno-Karzinomzellen (Zhao *et al.*, 2004) bekannt, dass Doxorubicin zu einer Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges führt. Es wurde daher in den Hct-116wt Zellen der PI3K/AKT Signalweg nach Inkubation mit

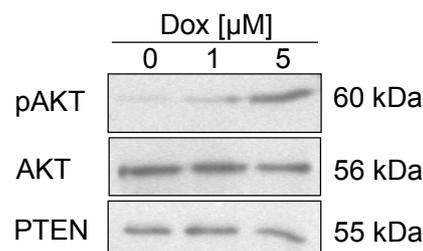


Abb.49: Wirkung von Doxorubicin auf den PI3K/AKT Signalweg.

72 h nach dem Ausplattieren wurden die Hct-116 Zellen mit 1 und 5 μ M Doxorubicin für 3 h inkubiert. Im Anschluss an die 24-stündige Nachinkubation in Medium wurde die Expression von AKT, pAKT (Serin473) und PTEN im Western Blot untersucht (n=3).

1 oder 5 μ M Doxorubicin untersucht. Abbildung 49 zeigt die Regulation des PI3K/AKT Weges nach Doxorubicin Inkubation. Durch Doxorubicin wurde eine dosisabhängige Phosphorylierung von AKT induziert. Die gesamte Proteinmenge an AKT wurde durch die Inkubation mit Doxorubicin nicht verändert. Des Weiteren wurde PTEN, der Antagonist des PI3K/AKT Signalweges, in seiner Expression nicht verändert.

Als Nächstes wurde die Wirkung des PI3K/AKT-Signalweges auf die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität untersucht. Die Hct-116 Zellen wurden unter der Annahme, dass eine Inhibierung dieses Signalweges die Zellen sensitiver gegen die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität machen sollte, mit einem dominant-negativem AKT Expressionsvektor transient transfiziert (zur Verfügung gestellt von Dr. Unfried, Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf, Deutschland;

Franke *et al.*, 1995). 72 h nach der transienten Transfektion wurden die Hct-116wt und DN-AKT Zellen mit verschiedenen Doxorubicin Konzentrationen für 3 h inkubiert. 27 h nach Beginn der Doxorubicin Inkubation wurde die Viabilität der Zellen mithilfe eines MTT-Assays bestimmt. Die Überexpression des dominant-negativen AKT führte zu einer signifikanten Sensitivierung der Hct-116DN-AKT Zellen im Vergleich zu den Hct-116wt Zellen (Abb.50A). Der EC_{50} -Wert für die Hct-116DN-AKT Zellen lag mit 2,8 μ M deutlich unter den 3,9 μ M für die Hct-116wt Zellen.

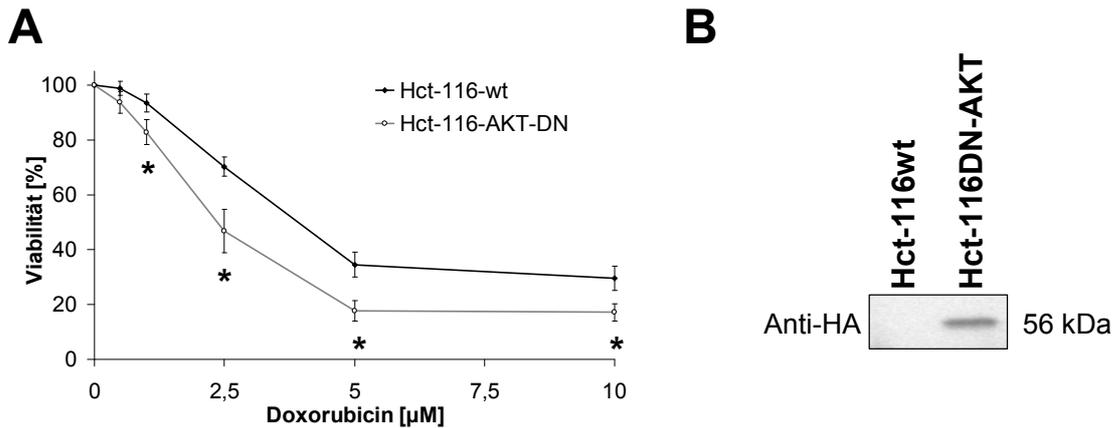


Abb.50: Doxorubicin Zytotoxizität in Hct-116wt und Hct-116DN-AKT Zellen.

72 h nach der transienten Transfektion wurden die Hct-116 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin für 3 h inkubiert. Im Anschluss an die 24 stündige Nachinkubation in Wachstumsmedium wurde die **(A)** Viabilität der Zellen mithilfe eines MTT Assay ermittelt. Die Viabilität ist prozentual bezogen auf die Kontrolle angegeben ($n=3$, $x \pm SEM$, $*p < 0,05$ signifikant zu den Hct-116wt Zellen, ANOVA). **(B)** Die Überexpression des dominant-negativen AKT wurde im Western Blot unter Verwendung des HA-Antikörpers gegen das HA-Tag des dominant-negativen AKT überprüft.

Die Überexpression des DN-AKT wurde im Western Blot 72 h nach der transienten Transfektion mithilfe eines Antikörpers gegen das HA-Tag des überexprimierten Proteins nachgewiesen (Abb.50B).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Doxorubicin Sensitivität in den Hct-116 Zellen von der Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges abhängig war. Die ursprüngliche Hypothese lautete, dass die Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges zu einer Inhibierung von FOXO4 führen sollte. Daher wurde die Regulation von FOXO4 nach Inkubation mit Doxorubicin auf Protein Ebene untersucht. Abbildung 51 zeigt die Regulation von FOXO4 in Abhängigkeit von Doxorubicin. Die Menge an phosphoryliertem FOXO4 (Serin 193) nahm dosis-abhängig in den Hct-116 Zellen zu. Parallel dazu verringerte sich die Menge an nicht phosphoryliertem FOXO4. Um deutlich zu machen, dass diese Phosphorylierung von FOXO4 gleichbedeutend ist mit einer Re-Lokalisation von FOXO4 in das Zytosol, wurde der FOXO4 Gehalt 24 h nach der Doxorubicin Inkubation in der zytosolischen und nukleären Fraktion

untersucht. Abbildung 51 zeigt eine deutliche dosisabhängige Abnahme von FOXO4 im Kern. Parallel dazu nahm die zytosolische Menge an FOXO4 zu.

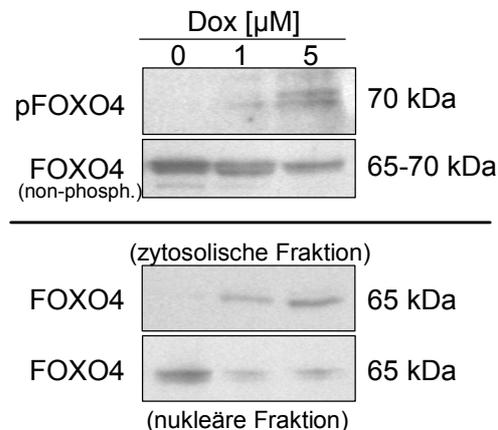


Abb.51: Wirkung von Doxorubicin auf FOXO4.

72 h nach dem Ausplattieren wurden die Hct-116 Zellen mit 1 und 5 μM Doxorubicin für 3 h inkubiert. Im Anschluss an die 24 stündige Nachinkubation in Medium wurde die Expression und Lokalisation von FOXO4 und pFOXO4 (Serin193) im Western Blot untersucht (n=3).

Da der Transkriptionsfaktor FOXO4 durch die Gabe von Doxorubicin phosphoryliert und inaktiviert wird, wurde als Nächstes die Phosphorylierung von FOXO4 in Abhängigkeit von der AKT Aktivität untersucht, um eine direkte Verknüpfung zwischen der Aktivierung von AKT und der Inaktivierung von FOXO4 herzustellen.

Dazu wurden die Hct-116 Zellen erneut mit dominant-negativem AKT transient transfiziert und die Phosphorylierung von FOXO4 wurde im Vergleich zu den Hct-116wt Zellen untersucht. Wie bereits in den Abbildungen 49 und 51 gezeigt, führte eine Inkubation der Hct-116wt Zellen mit Doxorubicin zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von Akt und nachgeschaltet zu einer Phosphorylierung, Inaktivierung und einem Austransport von FOXO4 aus dem Zellkern (Abb.52). In den Hct-116DN-Akt Zellen dagegen konnte keine Doxorubicin abhängige Phosphorylierung von AKT im Western Blot nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde FOXO4 als Zielmolekül von AKT weniger stark phosphoryliert, sodass das nukleäre Niveau an FOXO4 konstant blieb (Abb.52).

Bereits in Abbildung 50 konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des PI3K/AKT Signalweges durch die Überexpression von dominant-negativem AKT zu einer Sensitivierung der Hct-116 Zellen gegen Doxorubicin führte. Die Überexpression des dominant-negativen AKT war gleichzeitig mit einer Hypophosphorylierung von FOXO4 (Abb.52) verbunden. Bei einer Inkubation mit Doxorubicin wird der PI3K/AKT Signalweg aktiviert und FOXO4 über die AKT inaktiviert.

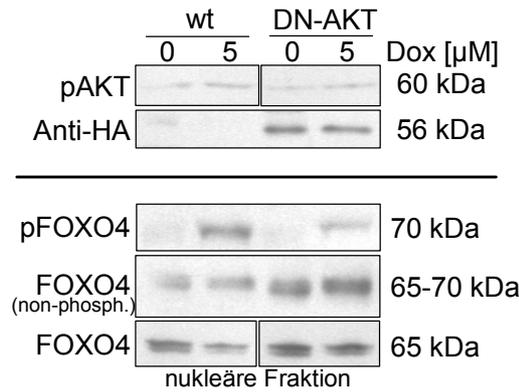


Abb.52: Doxorubicin induzierte Aktivierung von AKT und FOXO4.

72 h nach der transienten Transfektion mit dominant-negativem AKT wurden die Hct-116wt und DN-AKT Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin für 3 h inkubiert. Im Anschluss an die 24 stündige Nachinkubation in Wachstumsmedium wurde im Western Blot (n=3) die Phosphorylierung von AKT und FOXO4 und die Lokalisation von FOXO4 überprüft.

Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass FOXO4 als einer der Schlüsselfaktoren für die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität fungieren kann.

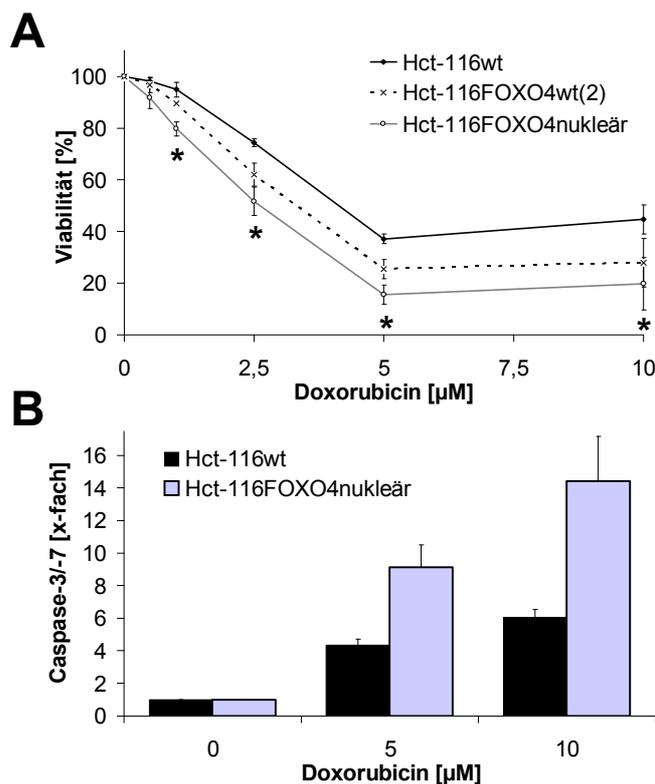


Abb.53: Doxorubicin Zytotoxizität und Apoptose in Hct-116wt, FOXO4wt und FOXO4nukleär Zellen. 72 h nach der transienten Transfektion mit FOXO4wt(2) und FOXO4nukleär wurden die Hct-116 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Doxorubicin für 3 h inkubiert. Im Anschluss an die 24 stündige Nachinkubation in Wachstumsmedium wurde **(A)** die Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt. Die Viabilität ist als prozentualer Anteil in Bezug auf die Kontrolle dargestellt (n=4, $x \pm SD$, * $p < 0,05$ signifikant zu den Hct-116wt Zellen, ANOVA). **(B)** Die durch Doxorubicin und FOXO4 Überexpression induzierte Apoptose wurde in einem APO-ONE Assay ermittelt (n=3, $x \pm SEM$).

Um diese Hypothese zu testen, wurden die Hct-116 Zellen erneut transient mit FOXO4 transfiziert. Zum einen wurde ein Expressionskonstrukt verwendet, das Wildtyp FOXO4 in den Zellen überexprimierte. Zum anderen wurden die Zellen mit FOXO4nukleär transfiziert. Dieses FOXO4 besitzt die Eigenschaft, dass alle 3 AKT abhängigen Phosphorylierungsstellen durch einen Basenaustausch zu Alanin mutiert sind und so keine Phosphorylierung durch AKT mehr erfolgen kann. Der FOXO4 Transkriptionsfaktor lag in den transient transfizierten Hct-116FOXO4nukleär Zellen somit entkoppelt vom PI3K/AKT Signalweg konstitutiv aktiv im Kern vor. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit verschiedenen Doxorubicin Konzentrationen für 3 h inkubiert und 27 h später wurde die Viabilität der Zellen über ein MTT-Assay bestimmt. Abbildung 53A zeigt, dass die Überexpression mit FOXO4wt zu einer signifikanten Sensitivierung der Zellen gegen Doxorubicin führte. Die Überexpression von nukleär lokalisiertem FOXO4 resultierte in einer zusätzlichen signifikanten Erhöhung der Doxorubicin Zytotoxizität in den Hct-116FOXO4nukleär Zellen im Vergleich zu den Hct-116FOXO4wt(2) Zellen (Abb.53A). Die EC₅₀-Werte verschoben sich von 4,3 µM für die Hct-116wt Zellen, über 3,3 µM für die Hct-116FOXOwt(2) Zellen bis auf 2,6 µM für die Hct-116FOXO4nukleär Zellen (Tabelle 6). Um

Tabelle 6: EC₅₀-Werte

	wt	FOXO4wt	FOXO4nukleär
EC ₅₀ [µM]	4.3	3.3	2.6

festzustellen, ob die erhöhte Doxorubicin Zytotoxizität auch auf eine erhöhte Induktion von Apoptose zurückzuführen war, wurden für die Hct-116wt und FOXO4nukleär Zellen nach transienter Transfektion und Doxorubicin Inkubation die Aktivität der Caspasen-3/-7 mithilfe des APO-ONE Assay gemessen. Abbildung 53B zeigt, dass in den FOXO4nukleär überexprimierenden Hct-116 Zellen eine deutlich stärkere Induktion der Caspase-3/-7 Aktivität auftritt. In den Hct-116FOXO4nukleär Zellen führt die Inkubation mit 5 und 10 µM Doxorubicin zu einer doppelt so starken Aktivierung der Effektorcaspasen. Die Funktionalität der FOXO4 Konstrukte wurde erneut über eine SEAP Reporter Assay mithilfe des 3xIRS Reporters getestet. Abbildung 54A zeigt eine signifikante Induktion der SEAP-Aktivität in den Hct-116FOXO4wt(2) Zellen 72 h nach der transienten Transfektion. Die Transfektion mit dem FOXO4nukleär Konstrukt führte zusätzlich zu einer gegenüber den Hct-116FOXO4wt(2) Zellen signifikanten, doppelt so stark induzierten transkriptionellen Aktivität. Die Überexpression der FOXO4 Proteine wurde zusätzlich

im Western Blot und die mRNA Expression über eine RT-PCR überprüft. Die Überexpression der FOXO4 Konstrukte ist in Abbildung 54B deutlich zu erkennen.

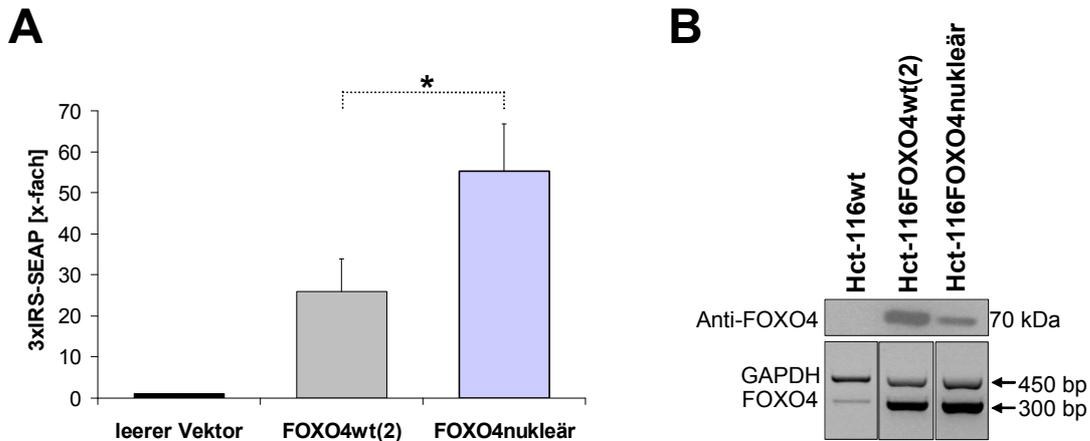


Abb.54: Überexpression von FOXO4wt(2) und FOXO4nukleär in Hct-116 Zellen.

Die FOXO4 Überexpression wurde 72 h nach transienten Transfektion (**A**) im SEAP-Assay nach Ko-Transfektion mit dem 3xIRS-SEAP Reporter ($n=4$, $x \pm \text{SEM}$, $*p < 0,05$ signifikant zu den Hct-116wt Zellen, ANOVA und (**B**) mittels Western Blot mit einem FOXO4 Antikörper und RT-PCR (PCR Bedingungen: GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; FOXO4: 1' 95°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 29 Zyklen) überprüft.

Neben dem Reporterassay wurde als Test zur Funktionalität der FOXO4 Konstrukte die Expression von FOXO4wt und nukleär im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dazu wurde die FOXO4 cDNA aus den FOXO4wt(2) und FOXO4nukleär Expressionsvektoren in den pEGFP-C1 Vektor umklontiert. Durch Fusion des EGFP

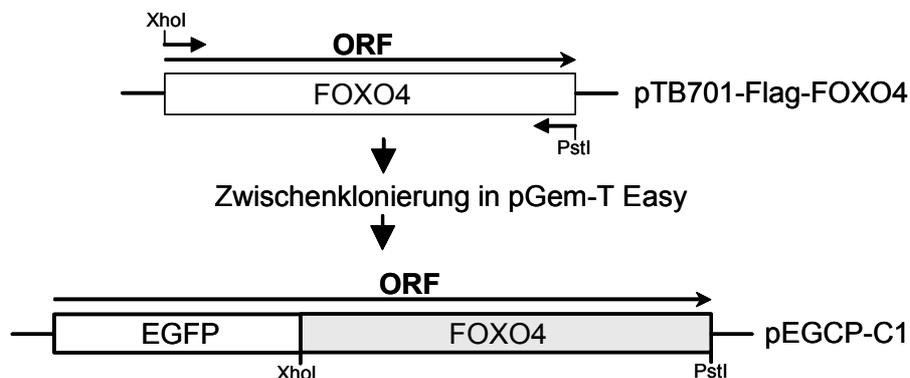


Abb.57: Klonierungsstrategie für die EGFP-FOXO4 Fusionskonstrukte.

Als Vorlage für die Amplifikation der humanen FOXO4 cDNA dienten die zwei FOXO4 Expressionsvektoren FOXO4wt(2) und FOXO4nukleär. Für die Amplifikation des FOXO4-ORF wurden die Primer so gewählt, dass sie die komplette kodierende Sequenz von FOXO4 einschlossen. Zusätzlich befand sich im 5'-Primer *upstream* des Start-Codons eine XhoI Schnittstelle und im 3'-Primer *downstream* vom Stop-Codon eine PstI Schnittstelle (PCR Bedingungen: 1' 95°C, 1' 65°C, 2' 72°C, 15 Zyklen mit *proof reading* Taq). Die Amplifikationsprodukte wurden in den pGem-T Easy Zwischenvektor ligiert. Im zweiten Schritt wurden die FOXO4 Fragmente aus dem pGem-T Easy Zwischenvektor mit Hilfe der in der PCR eingefügten Schnittstellen XhoI und PstI in den Endvektor pEGFP-C1 *in frame* umklontiert.

mit dem N-Terminus des FOXO4 Proteins entstand ein grün fluoreszierendes Fusionsprotein, das nach der transienten Transfektion im Mikroskop detektiert werden konnte. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 55 dargestellt.

Die Expression der Fusionsproteine wurde im Western Blot mithilfe des EGFP Antikörpers nachgewiesen (Abb.56). Durch die Fusion von FOXO4 an EGFP verschieben sich die detektierten Proteine von 27 kDa auf eine Größe von ca. 92 kDa

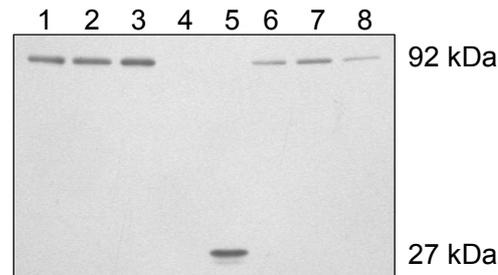


Abb.56: EGFP Western Blot nach Transfektion der EGFP-FOXO4 Klone in Hct-116 Zellen. 1 - 3: EGFP-FOXO4wt Klone; 1 = Klon2-1, 2 = Klon4-2, 3 = Klon6-3; 4 = untransfizierte Kontrolle; 5 = EGFP-C1 transfizierte Zellen; 6 - 8: EGFP-FOXO4nukleär; 6 = Klon1-1, 7 = Klon 3-2, 8 = Klon 5-3.

(FOXO4: 65 kDa + EGFP: 27 kDa). Um die Kernlokalisierung der EGFP-FOXO4nukleär Klone, die mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität verbunden ist, nachzuweisen, wurde ein SEAP-Reporterassay mit dem 3xIRS-SEAP Vektor durchgeführt.

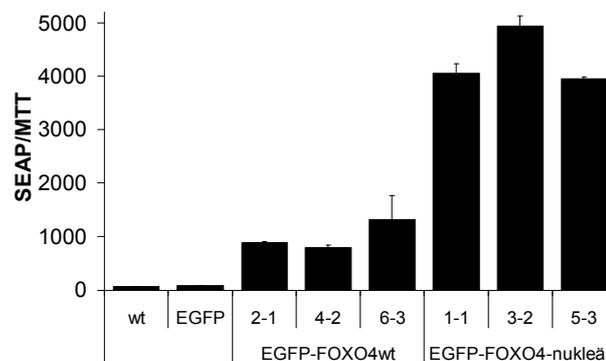


Abb.57: SEAP-Reporter Assay der EGFP-FOXO4 Klone.

48 h nach der transienten Transfektion der Hct-116 Zellen wurde die SEAP Menge im Zellüberstand bestimmt. Die Messwerte sind bezogen auf die Menge der viablen Zellen nach MTT Messung angegeben (n=2, x±SD).

Für die EGFP-FOXO4nukleär Klone zeigte sich eine ca. 5-fach stärkere transkriptionelle Aktivierung (Abb.57). Für die weiteren Versuche wurde für EGFP-FOXO4wt der Klon6-3 und für EGFP-FOXO4nukleär der Klon3-2 verwendet.

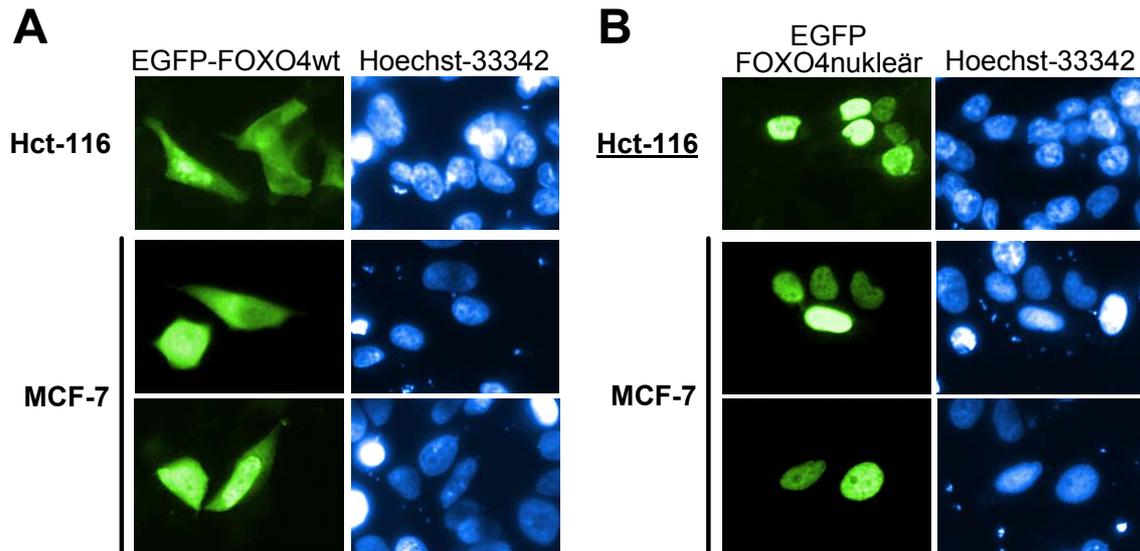


Abb.58: Expression von EGFP-FOXO4wt und EGFP-FOXO4nukleär in Hct-116 Zellen.

48 h nach der transienten Transfektion wurde die Lokalisation von (A) EGFP-FOXO4wt und (B) EGFP-FOXO4nukleär durch Expression von Fusionsproteinen in Hct-116 und MCF-7 Zellen überprüft. Dazu wurden die Zellkerne mit Hoechst-33342 angefärbt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Hct-116 und MCF-7 Zellen wurden mit dem EGFP-FOXO4wt Konstrukt transient transfiziert und 48 h nach der Transfektion wurden die Zellkerne mit Hoechst-33342 angefärbt. Die Verteilung von FOXO4 in den Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Abbildung 58A zeigt, dass sowohl in den Hct-116 als auch in den MCF-7 Zellen eine intermediäre Verteilung von FOXO4wt vorlag. FOXO4 war sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisiert. Im Gegensatz dazu führte die Transfektion mit dem konstitutiv aktiven EGFP-FOXO4nukleär Konstrukt wie erwartet zu einer eindeutigen nukleären Lokalisation von FOXO4 (Abb.58B).

Die Überexpression von FOXO4wt führte in den Hct-116 Zellen bereits zu einer Sensitivierung der Zellen gegen die Doxorubicin induzierte Toxizität. Um die zelluläre Verteilung von Wildtyp FOXO4 in den Hct-116FOXO4wt Zellen mit und ohne Doxorubicin Inkubation zu untersuchen, wurden die Zellen transient transfiziert, mit



Abb.59: Zelluläre Lokalisation von FOXO4 nach der Überexpression.

72 h nach der transienten Transfektion mit FOXO4wt(2) wurde die subzelluläre Lokalisation von FOXO4 in zytosolischer und nukleärer Fraktion im Western Blot unter Verwendung eines FOXO4 Antikörpers bestimmt.

Doxorubicin inkubiert und die nukleären Proteine auf ihren FOXO4 Gehalt im Western Blot untersucht. Abbildung 59 zeigt, dass in den Hct-116wt Zellen basal

bereits FOXO4 im Kern vorliegt, welches, wie erwartet und bereits in Abbildung 52 gezeigt, durch die Doxorubicin Inkubation reduziert wurde. In den Hct-116FOXO4wt Zellen war durch die Überexpression die FOXO4 Menge im Zellkern deutlich erhöht. Auch eine Inkubation mit 5 μ M Doxorubicin war nicht ausreichend um die Menge an FOXO4 im Kern zu reduzieren, sodass das nukleäre Kompartiment mit FOXO4 „überflutet“ war und es zu einer stärkeren Doxorubicin induzierten Toxizität kommen konnte.

Neben der Charakterisierung der Funktionalität und der Überexpression wurde die Wirkung der beiden FOXO4 Überexpressionskonstrukte auf den Selenoprotein Promotor untersucht. Die transkriptionelle Wirkung des konstitutiv aktiven FOXO4 wurde im Vergleich zum Wildtyp FOXO4 wie in Abbildung 54 über den Luziferase Reporter mit dem Selenoprotein Promotor gemessen. Abbildung 60A zeigt die Induktion der Luziferase Aktivität nach Transkription mit Wildtyp FOXO4. Nach Transfektion mit dem konstitutiv aktiven FOXO4nukleär war die Luziferase Expression noch einmal zusätzlich signifikant erhöht. Neben dem Reporterassay wurde eine RT-PCR für die Zielgene Katalase, Bcl-xl, BimEL und p21 durchgeführt. Hier zeigten sich die gleichen Ergebnisse wie in Abbildung 54. Weder die Expression der beiden FOXO4 Konstrukte noch eine zusätzliche Inkubation mit Doxorubicin hatte einen Einfluss auf die Expression der untersuchten Zielgene. Die Inkubation mit Doxorubicin führte in allen Zellen zu einer Repression der Katalase und einer

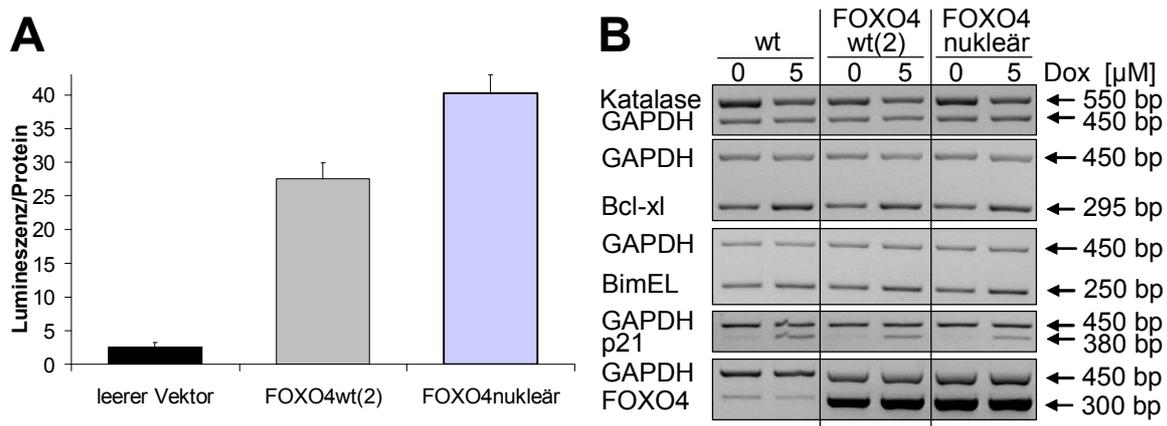


Abb.60: Doxorubicin und FOXO4-abhängige Targetgene.

72 h nach der transienten Transfektion mit FOXO4wt(2) oder FOXO4nukleär wurde die Expression von bekannten FOXO4 Targetgenen untersucht. **(A)** Die Zellen wurden mit einem pSE-Luc Reporter ko-transfiziert und die Reporteraktivität wurde mittels Luziferase Assay bestimmt (n=4, $x \pm$ SD). **(B)** Zusätzlich wurde die Expression einiger Moleküle auf mRNA Ebene bestimmt (n=3, PCR Bedingungen: Bcl-xl: 1' 95°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; BimEL: 1' 95°C, 1' 58°C, 2' 72°C, 28 Zyklen; FOXO4: 1' 5°C, 1' 62°C, 2' 72°C, 29 Zyklen; GAPDH: 1' 95°C, 45" 60°C, 2' 72°C, 24 Zyklen; Katalase: 1' 95°C, 1' 54°C, 2' 72°C, 26 Zyklen; p21: 1' 95°C, 1' 58°C, 2' 72°C, 17 Zyklen).

Induktion von p21, BimEL und Bcl-xl (Abb.60B). Der redox-sensitive Transkriptionsfaktor FOXO4 spielte demnach in den Hct-116 Kolon-Karzinom Zellen

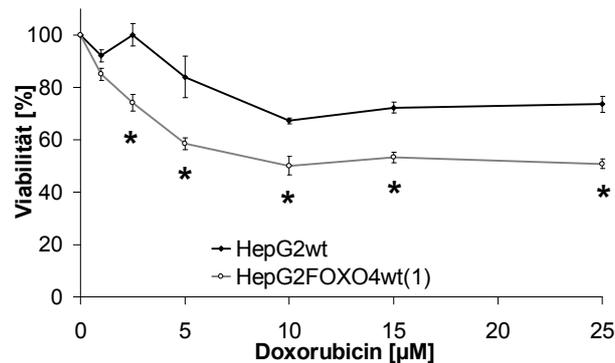


Abb.61: Doxorubicin Zytotoxizität in FOXO4 überexprimierenden HepG2 Zellen.

72 h nach der transienten Transfektion mit FOXO4wt(1) wurden die HepG2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin für 3 h inkubiert. Im Anschluss an die 24 stündige Nachinkubation mit Wachstumsmedium wurde die Viabilität der HepG2 Zellen über ein MTT-Assay bestimmt. Die Viabilität der Zellen ist prozentual zur jeweiligen Kontrolle angegeben (n=3, $\bar{x} \pm \text{SD}$, *p<0,05 signifikant zu den HepG2 Zellen, ANOVA).

eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der Doxorubicin induzierten Zytotoxizität und Apoptose. Um fest zu stellen, ob dieser Effekt allein auf die Hct-116 Zellen begrenzt war oder auch für eine andere Zelllinie galt, wurde Wildtyp FOXO4 in humanen HepG2 Hepatomzellen transient überexprimiert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 3 h mit Doxorubicin inkubiert und 27 h nach der Inkubation wurde die Viabilität der Zellen über ein MTT-Assay bestimmt. Abbildung 61 zeigt, dass die Wirkung von FOXO4 auf die Doxorubicin Zytotoxizität nicht allein auf die Hct-116 Zellen beschränkt war, sondern dass auch bei den HepG2 Zellen durch die Überexpression von FOXO4 eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität induziert werden konnte.

4. Diskussion

4.1 Modulation des endogenen Redox-Status

In der Literatur ist für die Katalase sowohl ein Schutz als auch eine Sensitivierung von Zellen gegen exogene Stimuli beschrieben. Die Überexpression der Katalase führte zu einem Schutz gegen Apoptose induziert durch H_2O_2 (Chen *et al.*, 2005), Menadion und Antimycin A (Bai und Cederbaum, 1999), Zytostatika (Bai und Cederbaum, 2003) und UVB Strahlen (Rezvani *et al.*, 2006; 2008). Andererseits konnte die Überexpression der Katalase mit einer verstärkten Zytotoxizität verknüpft werden. Während Bai und Cederbaum (2001) eine Sensitivierung der Zellen gegen TNF- α zeigten, konnten Brown *et al.* (1999) und Zanetti *et al.* (2002) eine Inhibierung der DNA Synthese und der Proliferation bei Überexpression der Katalase nachweisen. Die molekularen Mechanismen für die sehr unterschiedlichen Effekte, die durch die Katalase vermittelt werden, sind bisher im Detail noch nicht verstanden. Eine zentrale Rolle spielt dabei sicherlich das H_2O_2 , das spezifische Substrat der Katalase. H_2O_2 ist nicht einfach als pro-oxidativer Faktor und somit als zellschädigend zu betrachten, sondern besitzt bei physiologischen Konzentrationen in den Zellen eine wichtige Rolle als *second messenger* für die Signaltransduktion (Stone und Yang, 2006). Intrazelluläre Konzentrationen zwischen 0,001 μM und 0,7 μM H_2O_2 werden als physiologischer Bereich angesehen, innerhalb dessen die meisten Zellen weiter proliferieren können (Oshino *et al.*, 1973; Chance *et al.*, 1979; Antunes und Cadenas, 2001). In diesem physiologischen Bereich herrscht in den Zellen ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen. Kommt es jedoch zu einer Störung dieses Redox Gleichgewichts z. B. durch exogene Stimuli, so entsteht oxidativer Stress.

Das pleiotrope Zytokin TNF- α vermittelt seine zytotoxische Wirkung durch Bindung an membranständige Todesrezeptoren. Die dadurch in Gang gesetzten Prozesse können zu einer Akkumulation von ROS an den Mitochondrien führen (Dutta *et al.*, 2006). Das Anthrazyklinderivat Doxorubicin dagegen kann intrazellulär als Redox-Zykler die Akkumulation von ROS induzieren (Navarro *et al.*, 2006). Im ersten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung der so entstandenen ROS für den Wirkungsmechanismus der beiden exogenen Noxen untersucht: Durch Überexpression der Katalase wurde die Menge an intrazellulärem H_2O_2 reduziert und die Wirkung auf die TNF- α und Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität und die Regulation intrazellulärer Signalwege untersucht.

4.1.1 Katalase und TNF- α in MCF-7 Zellen

Die Bindung von TNF- α an den membranständigen Todesrezeptor TNF-R1 aktiviert sowohl pro- als auch antiapoptotische Prozesse. Neben den proapoptotischen Caspase Kaskaden kann über TNF- α auch eine Aktivierung von NF- κ B vermittelt werden. Die NF- κ B Aktivierung resultiert in der Regel in der transkriptionellen Aktivierung von antiapoptotischen Genen wie der MnSOD, die die Zellen gegen die TNF- α vermittelte Zytotoxizität schützen. Das Verhältnis zwischen diesen pro- und antiapoptotischen Prozessen entscheidet über das Schicksal der Zellen (Dutta *et al.*, 2006).

Um die Rolle der Katalase und der ROS bei der TNF- α vermittelten Sensitivität in MCF-7 Zellen zu untersuchen, wurde die Katalase sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien überexprimiert. Die Überexpression der zytosolisch lokalisierten Katalase führte zu einer um den Faktor 10 stärkeren Expression auf mRNA und Proteinebene. Auch die Katalase Aktivität war um Faktor 10 erhöht. Um die Katalase in den Mitochondrien zu exprimieren wurde mithilfe einer Fusions PCR die mitochondriale Leadersequenz (MLS) der MnSOD an den C-Terminus der Katalase fusioniert. Dies führte zu einer Erhöhung der Katalase Expression und Aktivität um den Faktor 6. Mithilfe einer zellulären Fraktionierung in zytoplasmatische und mitochondriale Fraktion konnte die Lokalisation der exprimierten Katalasen nachgewiesen werden. Die Katalase mit der vorgeschalteten MLS war vornehmlich in den Mitochondrien lokalisiert. Die Transfektion der unveränderten Katalase führte zu einer verstärkten Expression im Zytoplasma, eine kleine Katalase Menge war auch in den Mitochondrien nachzuweisen. Über eine Immunfärbung konnte zusätzlich die Verteilung der Katalase im Zytosol charakterisiert werden. Die Immunfärbung zeigte eine diffuse „pünktchenförmige“ Verteilung der Katalase im Zytoplasma. Auch Arita *et al.* (2006) konnten in alveolaren Maus Epithelzellen eine diffuse Verteilung der überexprimierten Katalase im Zytoplasma nachweisen. Diese Verteilung ist mit einer Lokalisation der Katalase in den Peroxisomen vereinbar. Um die Funktionalität der überexprimierten Katalasen in den MCF-7 Zellen nachzuweisen, wurden die Zellen mit H₂O₂ inkubiert. Die Überexpression sollte die Zellen gegen zytotoxische Konzentrationen an H₂O₂ schützen. In der Literatur liegen viele Beispiele vor, dass eine Überexpression der Katalase die Sensitivität gegen einen exogenen H₂O₂ Stimulus herabsetzt. Bai und Cederbaum (1999) konnten zeigen, dass die Expression von zytosolisch und mitochondrial lokalisierter Katalase humane HepG2

Hepatomzellen gegen H_2O_2 schützte. Die mitochondrial überexprimierte Katalase vermittelte dabei einen stärkeren Schutz als die zytoplasmatische Katalase, vermutlich durch die gezielte Protektion der besonders empfindlichen Mitochondrien gegenüber oxidativem Stress (Bai und Cederbaum, 1999). Auch Arita *et al.* (2006) erhielten das gleiche Ergebnis in alveolaren Epithelzellen der Maus.

In der vorliegenden Arbeit führte die Inkubation der MCF-7wt und MCF-7kat Zellen in Abwesenheit von FCS im Medium wie erwartet zu einem signifikanten Schutz der MCF-7kat Zellen gegen dem H_2O_2 Stimulus mit einem EC_{50} -Wert von 230 μM , während für die MCF-7wt Zellen ein sehr viel niedrigerer EC_{50} -Wert von 75 μM ermittelt wurde. Zusätzlich wurde ein Zytotoxizitätsassay in Gegenwart von FCS im Medium durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die MCF-7wt Zellen im Vergleich zur Inkubation ohne FCS deutlich resistenter gegenüber H_2O_2 waren (EC_{50} -Wert 500 μM). Smit-de Vries *et al.* (2007) konnten diesen Schutzeffekt von FCS ebenfalls zeigen und eine Verbindung zur Menge an freien Thiolgruppen herstellen. Die Menge an freien Thiolgruppen kann als Indikator für das Ausmaß an oxidativem Stress in den Zellen eingesetzt werden. Je weniger freie Thiole in den Zellen vorliegen, desto stärker sind diese geschädigt. Smit-de Vries *et al.* (2007) konnten für alveolare Lungenepithelzellen nachweisen, dass die Anzahl an freien Thiolgruppen im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge in den mit H_2O_2 in Abwesenheit von FCS behandelten Zellen deutlich reduziert war. Die Schutzfunktion der Katalase konnte in der vorliegenden Arbeit auch im Versuch ohne FCS bestätigt werden. Die mitochondrial exprimierte Katalase verlieh dabei die stärkste Resistenz gegen H_2O_2 . Erst ab einer Konzentration von ca. 500 μM konnte hier eine Abnahme der Viabilität nachgewiesen werden. In der verwendeten Konzentrationsspanne konnte allerdings sowohl für die MCF-7kat Zellen, als auch für die MCF-7mkat Zellen kein EC_{50} -Wert bestimmt werden.

Neben dem Schutz der Katalase gegen den H_2O_2 Stimulus wurde für die MCF-7wt, MCF-7kat und MCF-7mkat Zellen die intrazelluläre Akkumulation von ROS gemessen. Nach einer Bolusgabe von 1 mM H_2O_2 konnten die MCF-7wt Zellen die größte Menge an ROS intrazellulär akkumulieren. Die MCF-7kat und MCF-7mkat Zellen zeigten eine geringere Akkumulation von ROS. Die Ergebnisse bestätigten die Funktionalität der Katalase Expression in den MCF-7 Zellen. Die Katalase Expression verursachte einerseits einen Schutz der Zellen gegenüber der

zytotoxischen Wirkung von H_2O_2 . Andererseits konnte verdeutlicht werden, dass die Expression der Katalase zu einer Reduktion der intrazellulären ROS Menge führte.

4.1.2 Einfluss der Katalase auf die TNF- α Wirkung

Bai und Cederbaum (2000) konnten humane Hepatomzellen durch die Überexpression der Katalase gegen einen TNF- α Stimulus sensitivieren. Um herauszufinden welchen Einfluss die Katalase auf die TNF- α Wirkung in den MCF-7 Zellen ausübte, wurden die MCF-7 Zellen mit den beiden Katalase Konstrukten transfiziert und die Viabilität der Zellen nach Inkubation mit TNF- α bestimmt. Die Überexpression sowohl der zytoplasmatischen als auch der mitochondrialen Katalase führte zu einer Sensitivierung der Zellen gegen TNF- α , wie sie bereits von Bai und Cederbaum (2000) gesehen worden war. Der EC_{50} -Wert der MCF-7wt Zellen lag bei 15 ng/ml TNF- α . Interessanterweise zeigten sowohl die MCF-7kat und als auch die MCF-7mkat Zellen einen EC_{50} -Wert von 5 ng/ml TNF- α . Bei Bai und Cederbaum (2000) führte die Expression der Katalase in den Mitochondrien von Hepatomzellen zu einer, gegenüber der Katalase Expression im Zytoplasma, deutlicheren Erhöhung der TNF- α Sensitivität. Bai und Cederbaum (2000) nahmen an, dass dieser Effekt auftritt, weil TNF- α die Vermehrung der intrazellulären ROS durch seine Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette vermittelt. Die Mitochondrien besitzen neben der MnSOD, die die Disproportionierung von Superoxidradikalanionen zu H_2O_2 katalysiert, zur Entgiftung von H_2O_2 nur das Glutathion Peroxidase System. Die Überexpression der Katalase in den Mitochondrien verstärkt die mitochondriale Abwehr gegen das unter der Einwirkung von TNF- α vermehrt entstehende H_2O_2 (Bai und Cederbaum, 2000). In den MCF-7 Zellen konnte dieser mitochondriale Effekt der Katalase allerdings nicht nachgewiesen werden: Zwischen den MCF-7kat und den MCF-7mkat Zelle zeigte sich kein Unterschied in der TNF- α Zytotoxizität. Das könnte daran liegen, dass in den MCF-7 Zellen nicht alles H_2O_2 , das durch TNF- α gebildet wird, in den Mitochondrien entsteht. Köhler *et al.* (1999) konnten für dermale Hunde Fibroblasten zeigen, dass TNF- α neben der Akkumulation von H_2O_2 an den Mitochondrien auch die Entstehung von H_2O_2 an der Plasmamembran, dem Endoplasmatischen Retikulum und generell im Zytoplasma induzierte.

Die TNF- α vermittelte Zytotoxizität ist in der Regel mit einer Apoptose verbunden (Sethi *et al.*, 2007; Ekberg und Persson, 2008; Sharma *et al.*, 2008;

Yamaoka *et al.*, 2008). Nach Bindung der Adaptermoleküle TRADD und FADD kommt es zusammen mit der Caspase-8/-10 zur Bildung des DISC Komplexes und zur Autoaktivierung der Caspase-8/-10, die wiederum die Caspase-3/-7 aktiviert (Micheau und Tschopp, 2003; Shakibei *et al.*, 2005). Durch Akkumulation von ROS in den Mitochondrien oder durch Translokation des BH3-*only* Proteins Bid, das durch Caspase-8/-10 aktiviert wird, an die Mitochondrien kommt es zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges. Cytochrom c wird aus den Mitochondrien freigesetzt und nach Bildung des Apoptosoms wird die Caspase-9 aktiviert (Wajant *et al.*, 2003; Dutta *et al.*, 2006). Die TNF- α Inkubation führte auch in der vorliegenden Arbeit zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Caspase-3/-7. Dieses Ergebnis entsprach den Ergebnissen von Bai und Cederbaum (2000), die für die Hepatomzellen ebenfalls eine verstärkte Aktivierung der Caspase-3 nachweisen konnten. Da in der vorliegenden Arbeit die MCF-7kat und MCF-7mkat Zellen keinen Unterschied in der Zytotoxizität gegenüber TNF- α zeigten, wurde in den folgenden Versuchen nur noch die MCF-7wt und MCF-7kat Zellen betrachtet. Die Messung der Caspase-8/-10 und Caspase-9 Aktivitäten gab Aufschluss über die Aktivierung der Apoptose in den MCF-7 Zellen. In den MCF-7kat Zellen zeigte sich im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen eine stärkere Aktivierung der Caspase-8/-10. Auch die Caspase-9 wies in den MCF-7kat Zellen eine höhere Aktivität auf. Demnach war in den MCF-7kat Zellen sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptosesignalweg stärker aktiviert.

Für H4IIE Ratten Hepatomzellen konnte in der Arbeitsgruppe früher gezeigt werden, dass TNF- α resistente Zellen eine geringere Katalase Expression besitzen als TNF- α sensitive Zellen. Eine Hemmung der Katalase in den TNF- α sensitiven H4IIE Zellen führte zudem zu einem Schutz gegenüber der TNF- α vermittelten Zytotoxizität (Chovolou *et al.*, 2003). In Analogie zu diesen Befunden wurde angenommen, dass in den MCF-7wt Zellen die Inkubation mit TNF- α ebenfalls zu einer protektiven Reduktion der Katalase Menge führt. Tatsächlich war in den MCF-7wt Zellen die Katalase sowohl auf mRNA als auch auf Protein Ebene nach TNF- α Behandlung dosisabhängig signifikant reduziert. Auch die Katalase Aktivität zeigte eine signifikante Reduktion. Neben der Dosisabhängigkeit wurde die Kinetik der Katalase Expression auf mRNA Ebene untersucht. Die TNF- α Inkubation der MCF-7 Zellen führte bereits in den ersten 9 Stunden zu einer Repression der Katalase. Der Effekt von TNF- α auf die Katalase wird in der Literatur kontrovers dargestellt. Einige

Autoren beschreiben eine Repression der Katalase (Yasminah *et al.*, 1991; Beier *et al.*, 1997), andere finden keine Veränderung (Shaffer *et al.*, 1990; Siemankowski *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu gilt die Induktion der MnSOD als charakteristischer Effekt von TNF- α , der zum Schutz von Karzinomzellen des Mund-Hals Bereichs, epithelialen Karzinomzellen und Fibroblasten Zellen führt (Liu *et al.*, 2000; Delhale *et al.*, 2002; Ranjan und Boss, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Expression der Katalase in den MCF-7wt auch die Expression der MnSOD untersucht. Die Expression der MnSOD war in MCF-7wt und MCF-7kat Zellen auf mRNA und Protein Ebene signifikant dosisabhängig während der ersten 9 Stunden der TNF- α Inkubation induziert.

Durch die Induktion der MnSOD wurde mehr H₂O₂ in den Zellen produziert. Im Gegensatz dazu war die Katalase vermindert, was gleichbedeutend mit einem geringeren Abbau von H₂O₂ ist. In den TNF- α behandelten MCF-7wt Zellen ist die Menge von H₂O₂ in der Summe also erhöht. Die Überexpression der Katalase konnte in den MCF-7kat Zellen die durch die MnSOD Induktion erhöhte H₂O₂ Menge abbauen. Die Bedeutung von H₂O₂ für die Sensitivität gegen TNF- α konnte bereits von Dasgupta *et al.* (2006) gezeigt werden. In humanen Sarkomzellen führte die Überexpression der MnSOD und damit die Akkumulation von H₂O₂ zu einem Schutz der Zellen gegen die durch TNF- α induzierte Apoptose. Wurde parallel zur MnSOD auch die Katalase überexprimiert und so die intrazelluläre Menge an H₂O₂ reduziert, konnte die Sensitivität der Zellen gegen TNF- α wieder hergestellt werden (Dasgupta *et al.*, 2006).

Da die Überexpression der Katalase in den MCF-7 Zellen zu einer Sensitivierung der MCF-7 Zellen gegen den TNF- α Stimulus führte, ist anzunehmen, dass H₂O₂ auch in diesen Zellen als Effektor bei der TNF- α Wirkung eine wichtige Rolle spielt. Die proapoptotische Rolle der Katalase kann durch zwei verschiedene Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnte durch die Überexpression der Katalase H₂O₂, das für die Ko-Stimulation eines antiapoptotischen Signalweges benötigt wird, abgefangen werden. Zum anderen könnte durch den Abbau des H₂O₂ ein durch H₂O₂ hemmbarer proapoptotischer Mechanismus an Gewicht gewinnen. Aus der Literatur ist bereits eine Wirkung von H₂O₂ auf die Caspasen bekannt, die mit dem letztgenannten Mechanismus vereinbar ist: Hohe Konzentrationen an H₂O₂ führen zu einer reversiblen Inaktivierung der Caspasen, während niedrige Konzentrationen die

Aktivität der Caspasen nicht beeinflussen (Hampton *et al.*, 1997). Nach einer von H_2O_2 und Eisen ausgelösten Oxidation von Cysteinresten der Caspase-9 konnte diese nicht mehr aktiviert werden (Barbouti *et al.*, 2007). Hohe intrazelluläre H_2O_2 Konzentrationen können zudem die Aktivierung der Caspase-3 verhindern (Lee und Shacter, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des intrazellulären H_2O_2 auf die Caspasen nicht untersucht. Vielmehr wurde der Fokus auf den antiapoptotischen NF- κ B Signalweg gelegt.

Neben den proapoptotischen Effekten führt die Behandlung mit TNF- α auch zu einer Induktion von antiapoptotischen Proteinen. Diese Induktion wird in der Regel über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt (Wong und Goeddel, 1988; Wong *et al.*, 1989; Ranjan und Boss, 2006). Das Schicksal der Zellen ist dabei abhängig vom Verhältnis der induzierten pro- und antiapoptotischen Signalwege zueinander. Überwiegt die Aktivierung des NF- κ B Signalweges, sind die Zellen durch die Induktion antiapoptotischer Gene gegen die TNF- α vermittelte Zytotoxizität geschützt (Bernard *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2006). NF- κ B wird nach Bindung von TRADD, RIP1 und TRAF2 an die intrazelluläre Domäne des TNF-R1 aktiviert. Die Bildung dieses Komplexes führt zur Aktivierung der IKKs. Der NF- κ B Inhibitor I κ B α wird durch die IKKs phosphoryliert und darauffolgend vom Proteasom degradiert. NF- κ B kann dann in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen regulieren (Micheau und Tschopp, 2003; Shakibei *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2006). Die Rolle von H_2O_2 bei der Regulation von NF- κ B ist in der Literatur umstritten; H_2O_2 wird sowohl als aktivierender Stimulus (Canty *et al.*, 1999; Bonizzi *et al.*, 1999; Takada *et al.*, 2003) als auch als inhibierender Stimulus (Choi *et al.*, 2007; Zmijewski *et al.*, 2007) beschrieben. Der Effekt von H_2O_2 scheint dabei abhängig zu sein vom Zelltyp und den Versuchsbedingungen. Auch für den Spezialfall der NF- κ B Aktivierung durch einen TNF- α Stimulus ist die Rolle von H_2O_2 bei der Regulation von NF- κ B entweder als aktivierend (True *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2005) oder als inhibierend (Korn *et al.*, 2001; Panopoulos *et al.*, 2005) charakterisiert worden. Die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α wird in der Regel als Schutz gegen die induzierte Zytotoxizität und Apoptose verstanden. Da für die Katalase überexprimierenden MCF-7kat Zellen nach TNF- α Behandlung eine verstärkte Aktivierung der Apoptose gefunden wurde, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diesen Zellen das H_2O_2 als Ko-Aktivator für den antiapoptotischen NF- κ B Signalweg fehlte. Diese Rolle von H_2O_2 bei der NF- κ B Aktivierung konnte tatsächlich

nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen konnte in den MCF-7kat Zellen nur eine transiente Aktivierung von NF- κ B detektiert werden. Wie sich das Fehlen einer anhaltenden Aktivierung auswirkte, konnte über ein NF- κ B Reporter gen erfasst werden. Die TNF- α Inkubation der MCF-7kat Zellen führte zu einer gegenüber den MCF-7wt Zellen signifikant verminderten Transkription des Reporter gens. Dass die Aktivierung von NF- κ B in den MCF-7 Zellen tatsächlich abhängig von der intrazellulären H₂O₂ Konzentration war, konnte durch einen zusätzlichen H₂O₂ Stimulus gezeigt werden. H₂O₂ allein führte nicht zu einer Aktivierung von NF- κ B. Bei einer Ko-Inkubation der MCF-7kat Zellen mit TNF- α und H₂O₂ konnte jedoch die nukleäre NF κ B Menge erhöht und länger konstant gehalten werden. In der Literatur ist nur wenig über den Einfluss der Katalase auf die NF- κ B Aktivierung bekannt. Suzuki *et al.* (1995) untersuchten an COS-1 Zellen (Fibroblasten aus Affenieren) nach transienter Expression der Katalase ebenfalls die Wirkung auf die TNF- α induzierte Aktivierung von NF- κ B. Allerdings konnte in ihren Experimenten durch die Überexpression der Katalase keine Wirkung auf die NF- κ B Aktivierung gefunden werden. Schmidt *et al.* (1995) konnten für Mauszellen, die stabil die Katalase überexprimierten, zeigen, dass die Überexpression der Katalase die Aktivierung von NF- κ B verhinderte. Allerdings wurde von diesen Autoren nicht die Auswirkung des Effektes auf die Sensitivität der Zellen gegen TNF- α untersucht.

Kurz zusammengefasst konnte also gezeigt werden, dass die Inkubation mit TNF- α in MCF-7wt Zellen zu einer Repression der Katalase führte. Zusammen mit der durch TNF- α vermittelten Aktivierung der MnSOD löste dies eine Zunahme der Menge an intrazellulären ROS aus. H₂O₂ konnte so als Ko-Stimulator für die anhaltende Aktivierung des NF- κ B Überlebenssignalweges wirken. In den MCF-7kat Zellen dagegen führte die Überexpression der Katalase zu einer Reduktion der intrazellulären ROS Menge. Durch das Fehlen von H₂O₂ als Ko-Stimulator konnte der NF- κ B Signalweg nur noch transient aktiviert werden. Diese nur transiente Aktivierung von NF- κ B könnte sich in den Zellen auf zwei verschiedene Arten auswirken. Einerseits könnte sie generell zu einer geringeren Expression von NF- κ B regulierten Genen führen, sodass die Zellen weniger gegen die zytotoxische Wirkung von TNF- α geschützt waren. Für die Auswirkung einer Hemmung der NF- κ B Aktivierung bei Behandlung von Zellen mit TNF- α liegen in der Literatur Beispiele vor. Muenchen *et al.* (2000) konnten mithilfe eines I κ B α Superrepressors die TNF- α abhängige Aktivierung des NF- κ B Signalweges hemmen und so Prostata

Karzinomzellen gegen den TNF- α Stimulus sensibilisieren. Auch durch Verwendung einer selenorganischen Verbindung (Ebselen) konnte die Aktivierung von NF- κ B verhindert und Glioblastomzellen gegen die TNF- α induzierte Apoptose sensitiviert werden (Sharma *et al.*, 2008). Gunawardena *et al.* (2002) konnten die TNF- α abhängige Aktivierung von NF- κ B durch Ko-Inkubation mit Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC), einer antioxidativen Substanz, verhindern und so die TNF- α vermittelte Apoptose in Prostata Karzinomzellen erhöhen. Der Einsatz von MitoVit E (Mitochondrien spezifisches Vitamin E Derivat) hatte einen ähnlichen Effekt. Hier führte die Inkubation in Leukämiezellen zu einer zu späteren Zeitpunkten verschobenen Aktivierung von NF- κ B und einer stärkeren TNF- α Zytotoxizität (Hughes *et al.*, 2005). Andererseits könnte die verkürzte Dauer der Aktivierung ein anderes Expressionsmuster von NF- κ B abhängigen Genen zur Folge haben. Ahmed-Choudhury *et al.*, (2003) konnten zeigen, dass eine transiente Aktivierung von NF- κ B über den CD40 Liganden zusammen mit aktivem AP-1 zu einer Induktion von proapoptotischen Proteinen führte. Im Gegensatz dazu resultierte die persistente NF- κ B Aktivierung in Abwesenheit von AP-1 in einem antiapoptotischen Effekt. Für die MCF-7kat Zellen ist anzunehmen, dass die transiente NF- κ B Aktivierung eher dem ersten Mechanismus entsprach.

Zusätzlich ist zu beachten, dass die Aktivierung von NF- κ B in den meisten Zellen biphasisch verläuft. Es kommt durch die Aktivierung der IKKs und die Degradation von I κ B α zu einer schnellen Aktivierung von NF- κ B. Sobald die Aktivität der IKK wieder nachlässt und wieder mehr I κ B α durch Neusynthese vorliegt, wird nur noch wenig NF- κ B in den Zellkern translozieren (Kemler und Fontana, 1999; Hoffmann *et al.*, 2002). Die NF- κ B abhängigen Gene können daher in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfasst die Gene, die für ihre Expression eine anhaltende Aktivierung von NF- κ B benötigen. Für die Gene der zweiten Gruppe ist die frühe Aktivierungsphase von NF- κ B ausreichend, um die Expression auszulösen (Hoffmann *et al.*, 2002; 2006). Über diese differenzielle Regulation von NF- κ B abhängigen Genen könnte erklärt werden, warum sowohl in den MCF-7wt Zellen, die eine anhaltende Aktivierung zeigen, als auch in den MCF-7kat Zellen, mit transienter NF- κ B Aktivierung, das gleiche Ausmaß der Induktion der MnSOD nachzuweisen ist. Bei der MnSOD könnte es sich um ein Gen handeln, für das die transiente NF- κ B Aktivierung ausreichend ist, um eine starke Expression zu bewirken. Zusätzlich könnte die MnSOD Expression über weitere Transkriptionsfaktoren reguliert werden,

da der MnSOD Promotor auch Bindestellen für andere Transkriptionsfaktoren trägt. Es handelt sich dabei um Bindestellen für *activating protein-2* (AP-2) und *specificity protein-1* (SP-1) (Yeh *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2002), die beide redox-sensitiv reguliert werden können (Huang und Domann, 1998; Akiba *et al.*, 2003). Zusätzlich konnten St Clair *et al.* (2002) zeigen, dass eine Mutation in der NF- κ B Bindestelle des MnSOD Promotors nicht ausreichend war, um die Zytokin abhängige Induktion der MnSOD zu hemmen. Die TNF- α vermittelte Induktion der MnSOD wird daher vermutlich über NF- κ B und andere Transkriptionsfaktoren vermittelt.

Neben NF- κ B wurden in der vorliegenden Arbeit zwei weitere redox-sensitive Transkriptionsfaktoren untersucht. Als AP-1 (*activator protein-1*) werden Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die sich aus Homo- und Heterodimeren der *basic-leucine zipper* (bZIP) Proteine zusammensetzen. Zu den bZIPs gehören die Jun, Fos, ATF und JDP Proteine. Über die AP-1 Transkriptionsfaktoren wird die Expression von Genen für die Proliferation, die Transformation, aber auch für die Apoptose beeinflusst (Shaulian und Karin, 2001; 2002; Eichhorst *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2002, Lamb *et al.*, 2003). In den MCF-7wt Zellen führte die TNF- α Inkubation zu einer ausgeprägten Induktion der AP-1 Reporteraktivität. Im Gegensatz dazu konnte in den MCF-7kat Zellen nur eine geringe Induktion des AP-1 Reporters nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von AP-1 nicht weiter untersucht. Aus dem Reporterassay können daher nur spekulative Schlüsse gezogen werden. Je nach Zusammensetzung des AP-1 Transkriptionsfaktors könnte ein proliferativer oder ein proapoptotischer Effekt in den Zellen ausgelöst werden. Transkriptionsfaktoren mit der Untereinheit c-Jun regulieren dabei in erster Linie die Proliferation. JunB dagegen hat den gegenteiligen Effekt (Shaulian und Karin, 2002). Die TNF- α vermittelte Wirkung des AP-1 Transkriptionsfaktors in den MCF-7 Zellen könnte abhängig von den AP-1 Untereinheiten sein. TNF- α könnte vor allem zur Aktivierung von c-Jun Homodimeren führen, deren Translokation ebenfalls über H₂O₂ als Ko-Faktor reguliert wird. Die Überexpression der Katalase würde dann, ähnlich wie bei NF- κ B, zu einer reduzierten Translokation von AP-1 in den Kern führen. Durch die fehlende Aktivierung der Proliferation wären die Zellen gegen den TNF- α Stimulus zusätzlich sensitiviert. Andererseits kann AP-1 genauso wie NF- κ B über die IKKs aktiviert werden (Shifera *et al.*, 2008). Dies könnte auch in den MCF-7 Zellen der Fall sein. Durch die Überexpression der Katalase wurde in den MCF-7kat Zellen das für die NF- κ B Aktivierung nötige H₂O₂ abgebaut. Der Angriffspunkt des H₂O₂

innerhalb dieses Prozesses wurde jedoch nicht ermittelt. Wenn das H_2O_2 aktivierend auf die IKKs wirken würde, wäre diese Aktivierung in den MCF-7kat Zellen reduziert und würde sich daher nicht nur auf die NF- κ B Aktivierung, sondern auch auf die AP-1 Aktivierung, auswirken.

Zusätzlich zu AP-1 wurde auch die Reporteraktivität des Proto-Onkogens c-Myc untersucht. Bei c-Myc handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der ursprünglich als positiver Regulator für die Proliferation und die maligne Transformation nachgewiesen wurde (Bouchard *et al.*, 1998). Inzwischen ist jedoch klar, dass über c-Myc auch proapoptotische Zielgene reguliert werden können (Meyer *et al.* 2006). In den MCF-7 Zellen zeigte sich für die Reporteraktivität von c-Myc ein ähnliches Bild wie für die des AP-1. Die Überexpression der Katalase führte zu einer reduzierten Reporteraktivität nach Stimulation mit TNF- α . In myeloiden Leukämiezellen konnte für c-Myc ein proliferativer Effekt nach Inkubation mit TNF- α nachgewiesen werden. Die Inkubation der Zellen mit IFN γ führte zur Reduktion der c-Myc Proteinmenge und zur Induktion der Apoptose (Nakashima *et al.*, 2005). Benassi *et al.* (2006) konnten außerdem zeigen, dass c-Myc nach Induktion von oxidativem Stress in den Zellen H_2O_2 abhängig aktiviert wird. Die Aktivierung von c-Myc führte zur Verbesserung der Stressresistenz der Zellen. In den MCF-7 Zellen könnte demnach durch die Überexpression der Katalase und das Fehlen von H_2O_2 die Aktivierung von c-Myc verhindert gewesen sein, sodass c-Myc seine antiapoptotische Funktion nicht mehr ausüben konnte. Andererseits konnte von Salminen *et al.* (2008) gezeigt werden, dass die Expression von c-Myc NF- κ B abhängig reguliert werden kann. In den MCF-7kat Zellen könnte infolge der nur transienten Aktivierung von NF- κ B eine verminderte Expression von c-Myc und dadurch eine geringere Aktivierung von c-Myc abhängigen Genen vorgelegen haben.

In Cadmium induzierten Tumoren bei Mäusen wurde eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und c-Myc gefunden. Diese Aktivierung wurde ursächlich mit der malignen Transformation in Zusammenhang gebracht. Die Aktivierung konnte durch die Gabe von antioxidativen Enzymen (z. B. Katalase) verhindert werden und war somit abhängig von der intrazellulären ROS Menge (Joseph *et al.*, 2001). Diese Literaturstelle zeigt noch einmal deutlich, dass sowohl AP-1 als auch c-Myc bei der Proliferation von Tumorzellen eine Bedeutung haben und dass ihre Aktivierung über den intrazellulären ROS Status reguliert werden kann.

Dementsprechend verschiebt sich in den Katalase überexprimierenden MCF-7kat Zellen das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Signalwegen zur Apoptose.

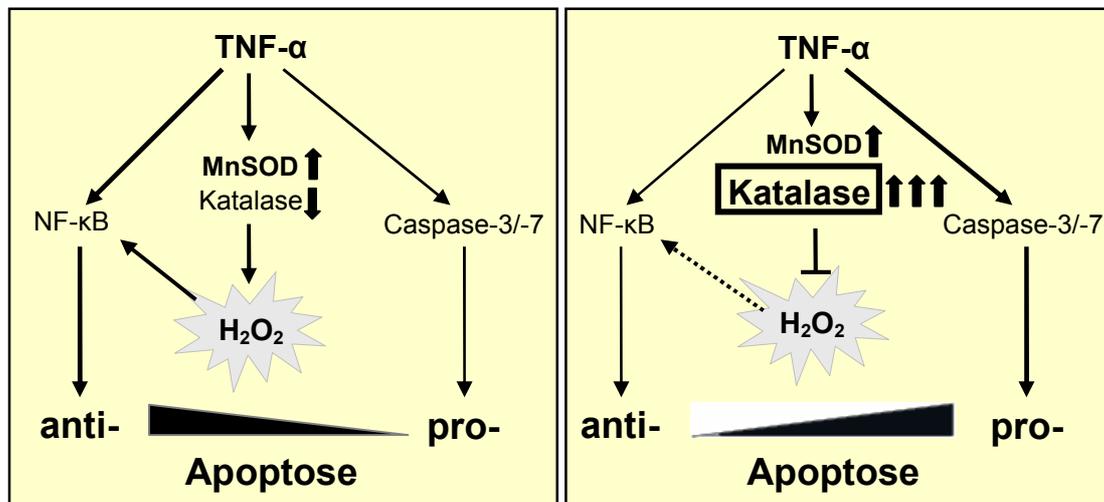


Abb.1: TNF- α Signaltransduktion in MCF-7wt und MCF-7kat Zellen.

Die TNF- α Inkubation führt in den MCF-7 Zellen zu einer Induktion der MnSOD und einer Repression der Katalase. Das so akkumulierte H₂O₂ ist notwendig für die Aktivierung des antiapoptotischen NF- κ B Signalweges. In den MCF-7wt Zellen (links) überlagert infolge ausreichender Versorgung mit intrazellulärem H₂O₂ die Aktivierung des antiapoptotischen NF- κ B Signalweges die durch Aktivierung der Caspasen vermittelte Apoptose. In den MCF-7kat Zellen dagegen führt die Überexpression der Katalase zum Abbau des für den NF- κ B Signalweg nötigen H₂O₂. Der NF- κ B Signalweg wird nur transient aktiviert. Das Gleichgewicht zwischen der pro- und antiapoptotischen Signaltransduktion verschiebt sich daher zur Apoptose.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in den MCF-7 Zellen H₂O₂ durch seine Rolle als Ko-Stimulator der NF- κ B Aktivierung als *second messenger* bei der TNF- α vermittelten Zytotoxizität identifiziert wurde. Abbildung 1 zeigt diese Zusammenhänge in einer vereinfachten Übersicht.

4.1.3 Katalase und FOXO3a

Neben NF- κ B können weitere intrazelluläre Signalwege und Transkriptionsfaktoren über den intrazellulären ROS Status reguliert werden. Der Transkriptionsfaktor FOXO3a ist ein Beispiel dafür. FOXO3a gehört zur Klasse O der Forkhead Transkriptionsfaktoren. Diese redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren sind unter anderem an der Regulation von Proliferation, Zell Zyklus, DNA Reparatur, oxidativem Stress und Apoptose beteiligt (Huang und Tindall, 2007). In seiner aktiven Form liegt FOXO3a nicht-phosphoryliert im Zellkern vor. Die in der Literatur am ausführlichsten beschriebene Regulation von FOXO3a erfolgt durch AKT-vermittelte Phosphorylierung und resultiert in einem Austransport von FOXO3a aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Huang und Tindall, 2007). Eine Akkumulation von H₂O₂

in den Zellen kann ebenfalls zu einem Austransport von FOXO3a aus dem Zellkern führen. Dieser Austransport wird ebenso über den PI3K/AKT Signalweg reguliert. Die Akkumulation von H₂O₂ führt zu einer Phosphorylierung der AKT und darauf folgende zu einer Phosphorylierung und Inaktivierung von FOXO3a (Nemoto und Finkel, 2002; Yin *et al.*, 2004). Für FOXO4 ist im Zusammenhang mit dem intrazellulären Redox-Status ein weiterer Regulationsmechanismus beschrieben (Essers *et al.*, 2004). Die Akkumulation von H₂O₂ führt hier zu einer JNK abhängigen Phosphorylierung von FOXO4. Diese Phosphorylierung resultiert in einer transkriptionellen Aktivierung von FOXO4 und führt zu einer Steigerung der Expression von MnSOD und Katalase. Die vermehrt exprimierten antioxidativen Enzyme wiederum können den intrazellulären Gehalt an H₂O₂ reduzieren und so in einem negativen Feedback den Stimulus für die Aktivierung von FOXO4 abfangen (Essers *et al.*, 2004).

Bis jetzt konnte noch keine Verknüpfung zwischen FOXO3a und TNF- α als pro-oxidativer Stimulus hergestellt werden. Lediglich wiederum für FOXO4 konnte gezeigt werden, dass ein TNF- α Stimulus zu der gleichen aktivierenden Phosphorylierung führt wie H₂O₂ (Essers *et al.*, 2004). Da im ersten Teil dieser Arbeit bereits eine Bedeutung der Katalase und des intrazellulären H₂O₂ für die Wirkung von TNF- α auf die MCF-7 Zellen nachgewiesen worden war, wurde in diesem Abschnitt die TNF- α abhängige Regulation eines FOXO Transkriptionsfaktors untersucht. Für die MCF-7 Mamma-Karzinomzellen wurde die Regulation von FOXO3a betrachtet, da in den MCF-7 Zellen eine starke FOXO3a Protein Expression gefunden wurde (AG Chovolou, unveröffentlichte Daten) und in der Literatur bereits Untersuchungen mit MCF-7 und FOXO3a vorlagen (Sunters *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007a; Zou *et al.*, 2008).

Die Expression von FOXO3a auf mRNA Ebene wurde für die MCF-7 Zellen nach Inkubation mit TNF- α untersucht. Innerhalb der ersten 6 Stunden der TNF- α Inkubation zeigte sich eine leichte Reduktion der FOXO3a Transkriptmenge, die jedoch ab Stunde 9 wieder leicht anstieg. Da FOXO3a in seinem aktiven Zustand im Zellkern lokalisiert ist, wurde als Nächstes die nukleäre Menge an FOXO3a nach Inkubation mit TNF- α betrachtet. Die MCF-7 Zellen wiesen im basalen Zustand eine starke Aktivierung von FOXO3a auf, d. h. im Zellkern konnte eine große Menge von FOXO3a nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit TNF- α kam es zu einer

Reduktion der nukleären FOXO3a Menge. Nach 5 Stunden war das Minimum an FOXO3a im Zellkern erreicht. Nach 8 Stunden konnte bereits wieder eine leichte Zunahme von FOXO3a im Zellkern detektiert werden. Der TNF- α vermittelte Austransport aus dem Zellkern könnte über die Menge an H₂O₂ in den Zellen reguliert werden. In Abschnitt 4.1.2 wurde bereits gezeigt, dass die Inkubation der MCF-7 Zellen mit TNF- α zu einer Induktion der MnSOD und einer Repression der Katalase führte. Der Gehalt an intrazellulärem H₂O₂ konnte durch diese Regulation erhöht werden. Man kann annehmen, dass für FOXO3a die Zunahme an H₂O₂ zu einem Austransport aus dem Zellkern führen könnte, da dieser Effekt für H₂O₂ bereits in der Literatur beschrieben wurde. Nemoto und Finkel (2002) konnten für Ratten Phächromozytomzellen des Knochenmarks zeigen, dass eine Inkubation mit H₂O₂ zu einer AKT abhängigen Phosphorylierung von FOXO3a und zu einer Lokalisation von FOXO3a im Zytoplasma führte. Im Gegensatz dazu löste die Inkubation der Zellen mit den Antioxidanzien N-Acetylcystein und Ebselen (ein Glutathionperoxidase Mimetikum) eine stärkere transkriptionelle Aktivierung eines FOXO3a Reportergens aus. Bei Yin *et al.* (2004) führte die Inkubation von Hct-116 Zellen mit H₂O₂ ebenfalls zu einer AKT abhängigen Phosphorylierung von FOXO3a. In der vorliegenden Arbeit konnte parallel zur Reduktion der nukleären FOXO3a Menge eine starke dosisabhängige Phosphorylierung von FOXO3a an einer AKT abhängigen Phosphorylierungsstelle durch TNF- α detektiert werden. Diese Phosphorylierung ließ sich mit dem Austransport von FOXO3a aus dem Zellkern vereinbaren. Parallel zur Reduktion der nukleären FOXO3a Menge in den ersten 5 Stunden konnte eine leichte Reduktion auf mRNA Ebene beobachtet werden. Man könnte dies so deuten, dass die mRNA Menge reduziert wird, um eine Akkumulation von FOXO3a Protein im Zytoplasma zu verhindern. Erst nach 8 Stunden war wieder ein Anstieg von FOXO3a im Zellkern zu erkennen. Parallel dazu konnte auch auf Transkriptebeine wieder eine leichte Zunahme der FOXO3a mRNA Expression gefunden werden. Die gemessene Zunahme der FOXO3a Menge im Zellkern zu diesem Zeitpunkt könnte mit der Neusynthese von FOXO3a erklärt werden. Allerdings zeigte die Gesamtmenge an FOXO3a Protein im Gegensatz zur Transkriptmenge über den Inkubationszeitraum mit TNF- α keine Veränderung. Diese könnte die Deutung der Abnahme der mRNA Menge bestätigen: Um eine Akkumulation von FOXO3a im Zytoplasma zu verhindern, ist die mRNA Menge soweit reduziert, dass die Gesamtmenge an FOXO3a in den MCF-7 Zellen konstant bleibt.

Die Expression der Katalase kann über die Bindung des FOXO3a Transkriptionsfaktors an den Promotor der Katalase reguliert werden (Nemoto und Finkel, 2002; Tan *et al.*, 2008). Um den Einfluss von FOXO3a auf die Katalase und im Vergleich dazu auch die Wirkung der Katalase Überexpression auf die FOXO3a Aktivierung zu untersuchen, wurde die Katalase wie bereits in Abschnitt 4.1.2 diskutiert im Zytoplasma überexprimiert. Für die Expression von FOXO3a wurden 2 Expressionskonstrukte verwendet. Zum einen wurde wildtypisches FOXO3a exprimiert (FOXO3awt) (Ramaswamy *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde ein mutantes FOXO3a überexprimiert. Im Gegensatz zum FOXO3awt sind bei diesem FOXO3a alle AKT abhängigen Phosphorylierungstellen mutiert, sodass ein Austransport aus dem Zellkern und somit eine Inaktivierung nicht mehr möglich ist (FOXO3a-AAA) (Ramaswamy *et al.*, 2002). Die Funktionalität dieser beiden Konstrukte wurde zum einen über die Aktivierung eines artifiziellen 3xIRS-Promotors (Fukuoka *et al.*, 2003) und zum anderen über den Promotor des Selenoproteins P bestimmt (Walter *et al.*, 2008). Die Expression von FOXO3awt führte zu einer Aktivierung beider Promotoren. In den FOXO3a-AAA Zellen konnte durch die konstitutive nukleäre Lokalisation von FOXO3a die Aktivierung beider Promotoren noch einmal signifikant erhöht werden. Neben der Aktivierung der beiden Promotoren im Reporterassay wurde die subzelluläre Verteilung von FOXO3a auf Zytoplasma und Zellkern überprüft. Während die Expression von FOXO3awt zu einer intermediären Verteilung von FOXO3a zwischen Zytoplasma und Zellkern führte, war das exprimierte FOXO3a-AAA wie erwartet im Zellkern nachzuweisen.

Die Interaktion zwischen FOXO3a und Katalase wurde auf Proteinebene untersucht. Es zeigte sich, dass in den MCF-7kat Zellen, im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen deutlich weniger FOXO3a im Zellkern lokalisiert war. Umgekehrt führte die Expression sowohl von FOXO3awt als auch von FOXO3a-AAA zu einer Zunahme der Katalase Proteinmenge. Diese Induktion der Katalase ist nicht verwunderlich, da bereits in der Literatur Hinweise vorliegen, dass FOXO3a an den Katalase Promotor binden kann und die Expression der Katalase induzieren kann (Nemoto und Finkel, 2002; Tan *et al.*, 2008). In den MCF-7 Zellen konnte jedoch auf Transkriptebeine in einem ersten Versuch keine Zunahme der Katalase mRNA Menge gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Vielmehr schien FOXO3a die Expression der Katalase auf posttranslationaler Ebene zu regulieren. Dies kann über die Abl Familie der Nicht-Rezeptor Tyrosin Kinasen vermittelt werden.

Cao *et al.* (2003b) konnten für MCF-7 Zellen zeigen, dass es nach Inkubation mit H_2O_2 in den Zellen zu einer Phosphorylierung (Tyrosin 231 und Tyrosin 386) der Katalase durch c-Abl und Arg kam. Diese Phosphorylierung führte zur Ubiquitinylierung und Degradation der Katalase durch das Proteasom. Umgekehrt bedingte eine Mutation der beiden Phosphorylierungsstellen eine längere Halbwertszeit des Katalase Proteins (Cao *et al.*, 2003a). FOXO3a könnte dementsprechend in den MCF-7 Zellen Einfluss auf die Phosphorylierung der Katalase nehmen und so die Halbwertszeit des Katalase Proteins verlängern.

Sowohl der Effekt der Katalase auf die Lokalisation von FOXO3a, als auch die verstärkte Katalase Expression nach Überexpression von FOXO3a lassen auf eine Wechselwirkung zwischen FOXO3a und der Katalase schließen. Die basale Katalase Menge wird durch nukleäre lokalisiertes FOXO3a reguliert. Ist die Katalase jedoch überexprimiert, ist diese Regulation nicht notwendig und die nukleäre FOXO3a Menge ist reduziert. Die Abnahme der nukleären FOXO3a Menge könnte so als Regulationsmechanismus für die Expression der Katalase erklärt werden. FOXO3a wird TNF- α abhängig inaktiviert und dementsprechend wird auch die Expression der Katalase durch TNF- α reduziert. Man könnte postulieren, dass eine Überexpression des konstitutiv aktiven FOXO3a-AAA bei einer Inkubation mit TNF- α die Repression der Katalase verhinderte. Tatsächlich war in einem ersten Experiment in den MCF-7FOXO3a-AAA Zellen keine Repression der Katalase nach Inkubation mit TNF- α zu detektieren. Die Abnahme der nukleären FOXO3a Menge in den MCF-7wt Zellen könnte daher tatsächlich, wie oben ausgeführt, als Regulationsmechanismus für die Katalase aufgefasst werden. Die Relokalisation nach 8 Stunden Inkubation mit TNF- α kann zwar über die Neusynthese von FOXO3a erklärt werden, dies würde jedoch auch wieder eine Zunahme der Katalase Proteinmenge nach sich ziehen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die nukleäre FOXO3a Menge in den MCF-7kat Zellen nach Inkubation mit TNF- α untersucht. In diesen Zellen liegt durch die Überexpression die Katalase bereits in „ausreichender“ Menge vor, sodass für eine Hochregulation über FOXO3a kein Anlass besteht. Bei einer TNF- α Inkubation der MCF-7kat Zellen kam es dennoch zu einem nukleären Import von FOXO3a. Daraus lässt sich schließen, dass FOXO3a in den MCF-7 Zellen nicht nur die Katalase, sondern weitere Proteine reguliert. In der Regel bedeutet eine nukleäre Lokalisation von FOXO3a die verstärkte Aktivierung der Apoptose. Die Inkubation von Kolon-Karzinomzellen mit Cisplatin führte zu einer Aktivierung und nukleären

Lokalisation von FOXO3a und zu einer Aktivierung der Apoptose (Fernandez de Mattos *et al.*, 2008). Withaferin A löste in Mamma-Karzinomzellen ebenfalls eine FOXO3a vermittelte Aktivierung der Apoptose aus (Stan *et al.*, 2008). Sowohl in den Kolon- als auch in den Mamma-Karzinomzellen führte ein Knockout von FOXO3a zu einem Schutz der Zellen gegen die verwendeten Stimuli (Fernandez de Mattos *et al.*, 2008; Stan *et al.*, 2008). FOXO3a könnte demnach aufgrund des nukleären Importes in den MCF-7kat Zellen an der Regulation von Mechanismen beteiligt sein, die die Apoptose in den MCF-7kat Zellen im Vergleich zu der in den MCF-7wt Zellen verstärken. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die MCF-7FOXO3a-AAA im Vergleich zu den MCF-7wt Zellen mit TNF- α inkubiert und ein Viabilitätsassay durchgeführt. Die Überexpression von konstitutiv aktivem FOXO3a führte in einem ersten Versuch zu einer Sensibilisierung der MCF-7 Zellen gegen den TNF- α Stimulus. Dieses Ergebnis verdeutlicht die mögliche proapoptische Rolle von FOXO3a in den MCF-7 Zellen.

Tabelle 1 zeigt zusammenfassend die für FOXO3a und Katalase gefundenen Effekte in den MCF-7 Zellen. Die MCF-7kat Zellen besaßen basal eine nur geringe nukleäre Menge an FOXO3a, die durch den TNF- α Stimulus induziert wurde. Die MCF-7wt Zellen dagegen besaßen basal viel FOXO3a im Kern, das nach TNF- α Stimulus zumindest in den ersten 5 Stunden austransportiert wurde.

Tabelle1: FOXO3a, Katalase und TNF- α in MCF-7 Zellen (o/e = Überexpression).

	FOXO3a (nukleär)		Katalase	
	basal	TNF- α	basal	TNF- α
MCF-7wt	↑	↘	→	↘
MCF-7kat	↓	↗	o/e	o/e
MCF-7FOXO3aAAA	o/e	o/e	↑	↑?

Die Aufgabe von FOXO3a in den MCF-7 Zellen scheint sich daher nicht nur auf die Regulation der Katalase Proteinmenge zu beschränken. Vielmehr lässt sich aus den Ergebnissen vermuten, dass die Katalase Proteinmenge basal von der FOXO3a Regulation abhängig ist. Nach einem Stimulus mit TNF- α jedoch könnten zusätzlich weitere proapoptische Mechanismen in Gang gesetzt werden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht werden konnten. Trotzdem zeigt sich auch aus diesen Versuchen, dass die Katalase und damit der intrazelluläre

Redox-Status für die Regulation von intrazellulären Signalwegen und Transkriptionsfaktoren von großer Bedeutung ist.

4.1.4 Einfluss der Katalase auf die Doxorubicin Wirkung in Hct-116 Zellen

Um die Rolle der Katalase in der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität in den Hct-116 Zellen zu untersuchen, wurde die Katalase im Zytosol überexprimiert. Die resultierende Zunahme der Katalase mRNA und Proteinmenge spiegelte sich in der 5-fachen Zunahme der Katalase Aktivität wider. Auch die Funktionalität des Enzyms konnte bestätigt werden: Wie erwartet waren die Hct-116kat Zellen, wie die MCF-7kat Zellen aus Abschnitt 4.1.1, gegen die zytotoxische Wirkung von H₂O₂ geschützt.

Für die Inkubation mit Doxorubicin wurden zwei verschiedene Inkubationszeiträume verwendet. Einerseits wurden die Zellen für 24 h mit Doxorubicin inkubiert (Langzeit). Andererseits erfolgte eine Inkubation mit Doxorubicin für 3 h. An diese Inkubation schloss sich eine Erholungsphase der Zellen in Doxorubicin freiem Medium für 24 h an (Kurzzeit). Diese beiden Inkubationszeiträume sollten Aufschluss auf mögliche Sensitivitätsunterschiede in Abhängigkeit von der Länge der Inkubation geben.

Die Inkubation der Hct-116wt und Hct-116kat Zellen mit Doxorubicin resultierte nach Inkubation für Kurz- oder Langzeit jeweils in einer moderaten Zytotoxizität. Zwischen den beiden Inkubationszeiträumen konnten nur minimale Unterschiede in der Zytotoxizität gefunden werden. Für die Kurzzeit Inkubation wurde ein EC₅₀-Wert von 4 µM bestimmt. Für die Langzeit Inkubation konnte kein EC₅₀-Wert ermittelt werden, da die Hct-116 Zellen ab einer Konzentration von 3 - 4 µM Doxorubicin bereits ein Plateau von 55 % viablen Zellen erreichten. Die Überexpression der Katalase hatte weder bei der Kurzzeit noch bei der Langzeit Inkubation einen Einfluss auf die Doxorubicin Zytotoxizität. Abou-El-Hassan *et al.* (2003) konnten in Kardiomyozyten der Maus ebenfalls zeigen, dass eine Überexpression der Katalase keinen Schutz gegen die Doxorubicin Zytotoxizität vermittelt. Ihre Vermutung ging dahin, dass die Expression der Katalase nicht stark genug war, um einen protektiven Effekt auszuüben. Bei einer stärkeren Expression der Katalase kam es jedoch zu pathologischen Veränderungen der Zellen, sodass diese Experimente nicht

ausgewertet werden konnten (Abou-El-Hassan *et al.*, 2003). Andererseits wurde *in vivo* und in Zellkulturmodellen ein protektiver Effekt der Katalase in Kardiomyozyten beschrieben. Eine verstärkte Expression der Katalase konnte die Doxorubicin vermittelte Akkumulation der ROS verhindern (Kang *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2002). Kang *et al.* konnten dabei sowohl einen protektiven Effekt gegen eine akute toxische Dosis (1996) als auch gegen eine chronische Behandlung (2002) mit Doxorubicin zeigen. Zusätzlich konnte im Zellkulturmodell mit humanen Zellen und Mauszellen, die unterschiedlich starke Katalase Aktivitäten zeigten, ein Effekt der Katalase auf die DNA Reparatur gefunden werden. Die Zellen mit stärkerer Katalase Expression waren resistenter gegen den Doxorubicin Stimulus und zeigten zusätzlich eine verbesserte DNA Reparatur (Gruber und Anuszewska, 1998).

Da in den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen kein Effekt der Katalase auf die Doxorubicin Zytotoxizität nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob die Doxorubicin Inkubation überhaupt zu einer Modulation der antioxidativen Enzyme MnSOD und Katalase führt. In der Literatur sind kontroverse Ergebnisse zur Regulation dieser beiden antioxidativen Enzyme nach einer Behandlung mit Doxorubicin zu finden. Doxorubicin kann zu einer Induktion der Katalase Expression und Aktivität führen (Yin *et al.*, 1998; Li und Singal, 2000; Röhrdanz *et al.*, 2000). Es ist jedoch auch beschrieben, dass Zellen, die eine Resistenz gegen Doxorubicin entwickelt hatten, eine geringere Menge an Katalase exprimierten als die zugehörigen Doxorubicin sensitiven Zellen (Kim *et al.*, 2001). Allerdings ist dieser Effekt nicht auf alle Doxorubicin resistenten Zellen zu übertragen. Während akut myeloische Leukämiezellen (AML) eine Repression der Katalase zeigten, konnte in promyeloischen Leukämiezellen (HL-60) Zellen keine veränderte Expression der Katalase detektiert werden (Kim *et al.*, 2001). Schließlich ist auch beschrieben, dass eine akute Behandlung von Mäusen *in vivo* mit Doxorubicin keinen Effekt auf die Expression der Katalase zeigte (Li und Verma, 2002). Die MnSOD konnte dagegen durch eine Inkubation mit Doxorubicin reprimiert werden (Röhrdanz *et al.*, 2000). Für Karzinomzellen des Magen-Darm Traktes ist beschrieben, dass Zellen mit einer höheren MnSOD Expression gegen die Behandlung mit Doxorubicin geschützt sind (Hur *et al.*, 2003).

In den Hct-116wt Zellen wurde die Expression von MnSOD und Katalase untersucht. Die Inkubation der Hct-116wt Zellen mit Doxorubicin für Kurzzeit und Langzeit führte auf mRNA und Proteinebene zu einer Reduktion der Katalase Expression. Auch die

Expression der MnSOD war nach Langzeit Inkubation mit Doxorubicin auf mRNA Ebene reduziert. Für die Kurzzeit Inkubation dagegen zeigte sich keine Veränderung der mRNA Menge. Auf Proteinebene wurde die MnSOD bei der Kurzzeit Inkubation mit 5 μM Doxorubicin auf ein 1,6-faches induziert, während die Langzeit Inkubation zu einer leichten dosisabhängigen Reduktion der MnSOD Proteinmenge führte.

Ein Charakteristikum von Doxorubicin, das als intrazellulärer Redox-Zykler wirken kann, ist die Akkumulation von ROS in den Zellen. In Kolon-Adenokarzinomzellen (Ubezio und Civoli, 1994), PC3 Prostata Krebszellen (Wagner *et al.*, 2005) und auch in H4IIE Ratten Hepatomzellen (Chovolou *et al.*, 2007) wurde diese Vermehrung von ROS bereits gezeigt. Auch in den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen konnte eine Akkumulation der ROS nachgewiesen werden. Während die Langzeit Inkubation bei allen drei gemessenen Doxorubicin Konzentrationen zu einer gleichmäßigen Akkumulation der ROS führte, konnte bei der Kurzzeit Inkubation die stärkste Akkumulation der ROS nach Inkubation mit 5 μM Doxorubicin nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Mengen an intrazellulären ROS lassen sich über die Regulation der antioxidativen Enzyme MnSOD und Katalase erklären. Die Langzeit Inkubation mit Doxorubicin führte zu einer deutlichen Repression der Katalase und zu einer leichten Repression der MnSOD auf Proteinebene. Die durch Doxorubicin induzierten Superoxidationradikale können daher in allen Konzentrationen noch von der MnSOD zu H_2O_2 disproportioniert werden. Das dabei entstehende H_2O_2 kann allerdings nur noch unzureichend abgebaut werden. Es kommt zu einer Akkumulation von H_2O_2 in den Zellen. Bei einer Kurzzeitinkubation mit Doxorubicin dagegen konnte eine Repression der Katalase und für die MnSOD nur bei 5 μM Doxorubicin eine Induktion der MnSOD nachgewiesen werden. Bei einer Behandlung mit 5 μM Doxorubicin ergibt sich durch die Induktion der MnSOD eine verstärkte Produktion von H_2O_2 . Bei einer Behandlung mit 1 μM und 10 μM Doxorubicin dagegen ist, im Vergleich zur 5 μM Doxorubicin Konzentration die MnSOD weniger aktiv. Es wird weniger H_2O_2 produziert und der Effekt der reduzierten Katalase kommt so weniger stark zum Tragen. Es werden daher weniger ROS in den Zellen akkumuliert.

Zusammenfassend zeigte die Überexpression der Katalase in den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen keinen Effekt auf die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität. Die Hct-116 Zellen waren weder gegen den Doxorubicin Stimulus sensibilisiert noch geschützt. Dennoch konnte durch die Behandlung der Zellen eine Wirkung auf die

Expression der MnSOD und der Katalase erzielt werden. Die differenzielle Regulation dieser antioxidativen Enzyme führte zur Akkumulation von ROS in den Zellen.

Die Versuche mit Doxorubicin zeigten, dass dieses zwar zu einer Akkumulation der ROS führte. Der forcierte Abbau von intrazellulärem H_2O_2 durch die Überexpression der Katalase blieb jedoch ohne Effekt auf die Doxorubicin Zytotoxizität. Entweder sind ROS in den Hct-116 Zellen bei der Doxorubicin Zytotoxizität kein wesentlicher Faktor oder die Doxorubicin Zytotoxizität wird über andere ROS als H_2O_2 vermittelt, die durch die Überexpression der Katalase nicht beeinflusst wurden. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten weitere durch Doxorubicin vermittelte Effekte in den Hct-116 Zellen aufgezeigt werden. Diese könnten dem möglichen protektiven Effekt der Katalase entgegenwirken.

4.2 Ausblick I

Tumorzellen besitzen häufig eine verminderte Expression von antioxidativen Enzymen und dementsprechend erhöhte intrazelluläre Mengen an ROS (Oberley und Oberley, 1997; Valko *et al.*, 2006). Diese Zunahme der wird häufig mit einem proliferativen Effekt in Verbindung gebracht, da einige intrazelluläre Signalwege, die das Zellwachstum regulieren, mithilfe von ROS als *second messenger* aktiviert werden können (Trachootham *et al.*, 2008; Matés *et al.*, 2008). In verschiedenen *in vivo* Modellen konnte die Bedeutung der Katalase für den Schutz gegen oxidativen Stress gezeigt werden. Der komplette Knockout der Katalase im Mausmodell führte bei Ho *et al.* (2004) zu einer normalen Entwicklung der Mäuse. Allerdings zeigten diese gewebespezifisch, je nach Vorliegen anderer Entgiftungssysteme für H_2O_2 , Schäden durch oxidativen Stress. Während im Gehirn pathologische Veränderungen gefunden wurden, waren die Lunge und die Linsen des Auges trotz des Fehlens der Katalase geschützt (Ho *et al.*, 2004). Eine weitere Versuchsreihe *in vivo* mit Mäusen wiederum führte zur verstärkten Ausbildung von Nieren Fibrosen in den Katalase Knockout Tieren (Kobayashi *et al.*, 2005). Die Überexpression der Katalase verlieh *in vivo* im Mausmodell den Zellen einen Schutz gegen H_2O_2 und Paraquat (Mele *et al.*, 2006). In einem anderen Mausmodell dagegen waren die Tiere gegen H_2O_2 , aber nicht gegen Paraquat und TNF- α geschützt. Die TNF- α Zytotoxizität war im Gegenteil in diesen Mäusen erhöht (Chen *et al.*, 2004). Koepke *et al.* (2008) dagegen konnten zeigen, dass eine Reduktion der Katalase Aktivität zu einem Altern von humanen Fibroblasten führte.

Diese Beispiele zeigen, dass die Katalase und der mit ihr verknüpfte intrazelluläre H_2O_2 Status nicht eindeutig mit einer schützenden Funktion für die Zellen verknüpft werden können. H_2O_2 wird als wichtiger *second messenger* angesehen, da es Membranen passieren kann und so in allen zellulären Kompartimenten zur Verfügung steht (Stone und Yang, 2006). In Keratinozyten konnte für H_2O_2 die Funktion als *second messenger* gezeigt werden. Keratinozyten, aus denen sich Karzinome entwickelten, zeigten eine erniedrigte Expression der Katalase und eine Aktivierung von AP-1. Über diese Aktivierung wurde die Proliferation der Zellen stimuliert. Wurde in den Keratinozyten die Expression der Katalase erhöht, zeigte sich nur noch eine geringe Aktivierung von AP-1 und die Zellen waren gegen die Proliferation und die maligne Transformation geschützt (Finch *et al.*, 2006; Hanke *et al.*, 2008). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde für die Menge an intrazellulärem H_2O_2 eine zentrale Bedeutung für die Regulation des antiapoptischen NF- κ B Signalwegs dokumentiert. Den MCF-7kat Zellen stand durch die Überexpression der Katalase nicht genügend H_2O_2 für die Stimulierung des NF- κ B Weges zur Verfügung, sodass es durch TNF- α zu einer stärkeren Induktion der Apoptose kam. Im Gegensatz dazu konnte in den Hct-116 Zellen kein Zusammenhang zwischen der Katalase Expression und der Doxorubicin Sensitivität gefunden werden.

Eine Inkubation mit TNF- α führt neben den hier untersuchten Signalwegen (NF- κ B, Apoptose, AP-1, c-Myc) zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden (JNK, MAPK) (Dutta *et al.*, 2006). Um eine umfassendere Aussage über die Bedeutung von H_2O_2 bei der TNF- α induzierten Signaltransduktion treffen zu können, müssten weitere Signalkaskaden im Vergleich zwischen den MCF-7wt und MCF-7kat Zellen untersucht und charakterisiert werden. Zusätzlich müsste der Zusammenhang zwischen TNF- α und dem Transkriptionsfaktor FOXO3a geklärt werden. Für dessen Beteiligung an der TNF- α Wirkung gibt es in der Literatur bis jetzt keine Daten. Da FOXO3a an der Aktivierung des Zelltods beteiligt ist, könnte hier ein neuer Signalweg für TNF- α aufgedeckt werden, der Tumorzellen gegen TNF- α sensitiviert. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Katalase zwei voneinander abzugrenzende Rollen spielen kann. Sie nimmt zum einen als antioxidatives Enzym eine wichtige Stellung in den Zellen ein: Bei einer Belastung mit hohen H_2O_2 Mengen schützt sie die Zellen gegen oxidative Schäden an Makromolekülen (Chen *et al.*, 2004; Mele *et al.*, 2006). Zum anderen kann, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, durch Veränderung der

Katalase Expression eine Modulation der physiologischen H_2O_2 Konzentration erreicht und damit in die Regulation von Signaltransduktionswegen eingegriffen werden (Finch *et al.*, 2006; Hanke *et al.*, 2008). Die Katalase ist demnach als wichtiger Modulator der intrazellulären H_2O_2 Konzentration zu verstehen. Die Effizienz des H_2O_2 Abbaus ist für die Zellen mitentscheidend über Proliferation, Apoptose oder die Akkumulation von Zellschäden. Das Beispiel des Doxorubicins zeigt jedoch, dass diese Sicht nicht für alle Zelltypen zu verallgemeinern ist. In Kardiomyozyten z. B. führte die Überexpression der Katalase zu einem Schutz gegen die Doxorubicin induzierte Kardiomyopathie (Kang *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2002). In den Kolon-Karzinomzellen dagegen konnte dieser Effekt der Katalase nicht gefunden werden. Die Wirkung der Katalase ist offenbar neben dem Zelltyp auch vom angewendeten Stimulus abhängig.

4.3 Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Doxorubicin

Eine wiederholte Applikation von Doxorubicin kann zu einer Resistenz der Zellen gegen die Doxorubicin vermittelte Apoptose führen. Diese Resistenzentwicklung ist ein großes Problem der Krebstherapie. Es ist daher notwendig, die Wirkweise von Doxorubicin und die durch Doxorubicin induzierten Mechanismen und Signalwege in Krebszellen besser zu verstehen, um Behandlungen mit Doxorubicin zu optimieren. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von Doxorubicin auf Hct-116 Kolon-Karzinom Zellen untersucht. Unter Verwendung der zwei in Abschnitt 4.1.4 bereits eingeführten Inkubationszeiträume wurde die Zytotoxizität, die Regulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, der induzierte Zelltod, die Morphologie der Zellen und die Regulation des Zellzyklus betrachtet.

Bei den Versuchen zur Bedeutung der Katalase bei der Doxorubicin Wirkung wurde die Zytotoxizität von Doxorubicin bereits diskutiert. Sowohl bei der Kurz- als auch bei der Langzeit Inkubation konnte eine moderate Zytotoxizität der Hct-116 Zellen gemessen werden. Aus der Literatur ist die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin für verschiedene Zellen bereits beschrieben. Für Hct-116 Zellen lagen die in dieser Arbeit gemessenen EC_{50} -Werte dabei im Rahmen der Literaturwerte: $1,1 \mu\text{M}$ für 72 h Doxorubicin Inkubation (DeFeo-Jones *et al.*, 2000), $3,5 \mu\text{M}$ für 24 h Inkubation (Ma *et al.*, 2008), $0,4 \mu\text{M}$ für 1 h Doxorubicin mit nachfolgender Inkubation der Zellen in frischem Wachstumsmedium (Ravizza *et al.*, 2004). Auch für Hepatomzellen wurden nach 36 h Inkubation mit Doxorubicin EC_{50} -Werte in diesem Bereich beschrieben (Huh7: $0,9 \mu\text{M}$; Hep3B: $12,4 \mu\text{M}$; HepG2: $28,4 \mu\text{M}$) (Lee *et al.*, 2002).

Die durch Doxorubicin entstehenden DNA Schäden können eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen aktivieren und modulieren. Dazu gehört auch der NF- κ B Signalweg. Die Bedeutung von NF- κ B für die Doxorubicin Zytotoxizität wird jedoch kontrovers diskutiert. NF- κ B kann nach der Aktivierung durch Doxorubicin einen antiapoptotischen Effekt in den Zellen ausüben. Sowohl für Hela Zellen (Bottero *et al.*, 2001) als auch für Mamma-Karzinomzellen (Kim *et al.*, 2006) wurde eine NF- κ B abhängige Induktion von antiapoptotischen Genen und ein NF- κ B vermittelter Schutz gegen Doxorubicin beschrieben. NF- κ B kann jedoch auch proapoptotisch die Wirkung von Doxorubicin unterstützen. Für verschiedene Zelllinien und auch in vivo konnte bereits ein proapoptotischer Effekt von NF- κ B gezeigt werden (Wang *et al.*, 2002; Tergaonkar *et al.*, 2003; Ashikawa *et al.*, 2004;

Chovolou *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007b; Lin *et al.*, 2007). In Mamma-Karzinomzellen führte die Behandlung mit Doxorubicin zu einer Aktivierung von NF- κ B, die jedoch in einer Repression von typischen NF- κ B Zielgenen resultierte (Ho *et al.*, 2005). Um festzustellen, ob der NF- κ B Signalweg in den Hct-116 Zellen durch Doxorubicin aktiviert wird, wurde mithilfe eines Reporterassays die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B gemessen. Bei einer Kurzzeit Inkubation mit Doxorubicin konnte eine minimale Aktivierung des Reporters bei 1 und 5 μ M nachgewiesen werden. 10 μ M Doxorubicin dagegen führten zu einer Repression. Bei einer Langzeit Inkubation zeigte sich bei 1 μ M keine veränderte Reporteraktivität. Bei den beiden höheren Konzentrationen kam es ebenfalls zu einer Repression. Zusätzlich wurden typische NF- κ B Zielgene auf Transkriptebene untersucht. Zu den bekannten NF- κ B Zielgenen gehört das Zink-Finger Protein A20, welches rezeptorvermittelte Signalkaskaden inhibieren und Zellen gegen Apoptose schützen kann (Beyaert *et al.*, 2000; Wertz *et al.*, 2004). Auch einige Mitglieder der Bcl-2 Familie sind bekannte NF- κ B Zielgene. Dazu gehören das antiapoptotisch wirkende Bcl-xl und das proapoptotisch wirkende Bax (Grimm *et al.*, 2005; Grossmann *et al.*, 2000; Catz und Johnson, 2001). XIAP ist ein weiteres NF- κ B Zielgen und gehört zu den *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), die die Aktivierung der Caspase-9 verhindern (Liston *et al.*, 2003; Wright und Duckett, 2005). Die Expression der NF- κ B Zielgene XIAP, Bcl-xl und Bax korrelierte in beiden Inkubationsschemata mit der im Reporterassay gemessenen transkriptionellen Aktivität von NF- κ B. Nur die Expression des Zinkfingerproteins A20 war bei 10 μ M Doxorubicin nicht reprimiert, sondern noch leicht induziert. Für die Langzeit Inkubation mit 1 μ M lag keine Veränderung oder eine leichte Induktion der Zielgene vor. Bei den beiden höheren Konzentrationen dagegen waren alle mRNA Transkripte fast komplett reprimiert. In Ratten Herzmuskelzellen, Ratten Hepatomzellen und Mamma-Karzinomzellen konnte eine Induktion des proapoptotischen Faktors Bax gefunden werden (Wang *et al.*, 1998; Chovolou *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007a). Das antiapoptotische Bcl-xl dagegen schützt Hepatomzellen gegen die Doxorubicin vermittelte Apoptose (Park *et al.*, 2007). Für XIAP ist sowohl eine Induktion (Abe *et al.*, 2007) als auch einer Repression (Gagnon *et al.*, 2008) und damit verbunden die Aktivierung der Apoptose oder ein Schutz der Zellen gegen Doxorubicin beschrieben. Zusammenfassend lässt sich für die Hct-116 Zellen sagen, dass keine eindeutige Regulation von pro- oder antiapoptotischen Zielgenen in Richtung einer identifizierbaren Zellantwort gefunden

werden konnte. Die transkriptionelle Regulation von NF- κ B und auch der Zielgene korrelierte auch nicht mit der gemessenen Zytotoxizität. Es ist daher zu vermuten, dass NF- κ B bei der Vermittlung der Doxorubicin Zytotoxizität in den Hct-116 Zellen nicht von singulärer Bedeutung ist.

Neben NF- κ B wurde, wie nach TNF- α (siehe 4.1.2), die transkriptionelle Aktivität der AP-1 Transkriptionsfaktoren nach Doxorubicin bestimmt. In den Hct-116 Zellen zeigte sich bei der Kurzzeit Inkubation das gleiche Bild wie bei NF- κ B. Bis auf eine viel ausgeprägtere Aktivierung nach 1 μ M Doxorubicin. Dhandapani *et al.* (2007) konnten für Glioblastomzellen zeigen, dass die Aktivierung von AP-1 zu einer Protektion gegenüber der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität führte. Die Expression des *multidrug resistance-associated protein-1* (MRP1) wird z. B. über AP-1 reguliert und den Zellen wird so eine Resistenz gegen Doxorubicin verliehen (Shinoda *et al.*, 2005). Zusätzlich konnten Levina *et al.* (2008) zeigen, dass Doxorubicin zur Aktivierung von AP-1 und daraus folgend zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Expression von Zytokinen in Tumorzellen führte, die wiederum einen Schutz gegen Doxorubicin vermittelten.

NFAT ist ein Transkriptionsfaktor, der nach seinem Vorkommen in T-Lymphozyten benannt ist (nuclear factor of activated T-lymphocytes) (Macian, 2005). NFAT wird über Kalzium und Calcineurin reguliert. Eine Calcineurin abhängige Dephosphorylierung resultiert im nukleären Import von NFAT und in der Regulation von Zielgenen (van Rooij *et al.*, 2002; Wilkins *et al.*, 2004). Für eine Ratten Kardiomyozyten Zelllinie ist beschrieben, dass eine Inkubation mit Doxorubicin zu einer NFAT abhängigen Expression des Fas Liganden (FasL) führte. Das exprimierte FasL wiederum konnte die durch Bindung an den Fas Rezeptor die Doxorubicin vermittelte Apoptose verstärken (Kalivendi *et al.*, 2005). In den Hct-116 Zellen zeigte sich weder bei einer Kurz- noch bei einer Langzeit Inkubation eine Zunahme der transkriptionellen FasL Aktivität. Die transkriptionelle Aktivität von NFAT war im Gegensatz zur Literatur dosisabhängig reprimiert. Da keine weiteren Zielgene von NFAT untersucht wurden, lässt sich keine Aussage zur molekularen Wirkung von NFAT in den Hct-116 Zellen treffen. Eine Möglichkeit wäre eine NFAT vermittelte Repression von pro- oder antiapoptotischen Genen. Diese ist in der Literatur allerdings noch nicht beschrieben.

Als letzter Transkriptionsfaktor wurde, wie nach TNF- α (siehe 4.1.2), das Proto-Onkogen c-Myc untersucht. Der Transkriptionsfaktor c-Myc kann sowohl zur malignen Transformation (Bouchard *et al.*, 1998) als auch zur Induktion von proapoptotischen Genen beitragen (Meyer *et al.*, 2006). In humanen Kolon-Karzinomzellen führte die Hemmung von c-Myc zu einer stärkeren Sensitivität gegen Doxorubicin. Dem Transkriptionsfaktor c-Myc kam in diesen Zellen eine schützende, proliferative Wirkung zu (Abaza *et al.*, 2008). Gorrini *et al.* (2003) erhielten gegensätzliche Befunde: Je höher die Expression von c-Myc in Kolon-Karzinomzellen war, desto stärker kam es in diesen Zellen auch zu einer Doxorubicin vermittelten Apoptose. In den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen zeigten sich zwischen der Kurz- und der Langzeit Inkubation deutliche Unterschiede. Die Kurzzeit Inkubation führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung von c-Myc. Bei der Langzeit Inkubation dagegen kam es nur bei 1 μM Doxorubicin zu einer minimalen Aktivierung von c-Myc. Bei den beiden höheren Konzentrationen zeigte sich keine Veränderung. Da die Doxorubicin Inkubation in beiden Fällen zu einer Abnahme der Viabilität führte, ist anzunehmen, dass die Aktivierung von c-Myc nur zu frühen Zeitpunkten mit einer durch Doxorubicin vermittelten Apoptose im Zusammenhang steht.

Als Nächstes wurde in den Hct-116 Zellen die Apoptose gemessen, um zu bestätigen, dass diese in den Hct-116 Zellen tatsächlich in Abhängigkeit von c-Myc reguliert wurde. Tatsächlich führte die Kurzzeit Inkubation mit Doxorubicin zu einer dosisabhängigen Aktivierung der Apoptose. Bei einer Langzeit Inkubation mit Doxorubicin konnte wie bereits bei c-Myc ebenfalls nur eine leichte Aktivierung der Apoptose bei 1 μM Doxorubicin nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse passen zu den Daten von Gorrini *et al.* (2003) und lassen vermuten, dass in den Hct-116 Zellen der Transkriptionsfaktor c-Myc als ein früher Mediator für die Aktivierung der Apoptose wirken kann, dass aber die im weiteren Verlauf beobachtete Zytotoxizität nicht auf eine Aktivierung der Apoptose zurückzuführen ist.

Es musste deshalb ausgeschlossen werden, dass in den Langzeit inkubierten Hct-116 Zellen eine Nekrose oder eine andere Form von Zelltod vorlag. In T-Lymphozyten konnte bereits eine durch niedrige Doxorubicin Dosis induzierte Nekrose nachgewiesen werden (Sugimoto *et al.*, 2002). Zusätzlich ist für eine Inkubation mit Doxorubicin die mitotische Katastrophe als zytotoxischer Weg

beschrieben. Die mitotische Katastrophe umfasst einen Apoptose ähnlichen Zelltod, der über die Aktivierung der Caspase-2 induziert wird. Kommt es während der Mitose zu einer Fehlverteilung der Chromosomen, so können die Zellen während des Übergangs zwischen Anaphase und Telophase auf diesem Wege vernichtet werden. Ist dieser Mechanismus in den Zellen nicht funktionsfähig, führt die anschließende Teilung der Zellen in der Regel zu Aneuploidien (Castedo *et al.*, 2004). Für die Hct-116 Zellen ergab sich parallel zur Apoptose eine Abnahme der viablen Zellen und eine signifikante Zunahme der toten Zellen, die auch im mikroskopischen Bild bestätigt werden konnte. Die Langzeit Inkubation führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Eine signifikante Zunahme von toten Zellen war allerdings nur bei 1 μM Doxorubicin nachzuweisen. Im mikroskopischen Bild konnten kaum tote Zellen ausgemacht werden, sodass sich auch dieses Ergebnis über das optische Bild bestätigen ließ. Dies zeigt, dass die Langzeit Inkubation der Hct-116 Zellen weder zu einem apoptotischen noch zu einem nekrotischen Zelltod führte, sondern dass ein anderer Mechanismus für die Reduktion der Zellzahl in diesen Zellen vorliegen muss.

Neben dem Zelltod kann eine Inkubation mit Doxorubicin zu einem Arrest der Zellen führen. Der Zellzyklus setzt sich aus zwei Phasen zusammen. Die Interphase und die Mitose (M) Phase. Die Interphase gliedert sich zusätzlich in die Abschnitte G1, S und G2 Phase. In dieser Phase werden alle nötigen Zellbestandteile verdoppelt, die dann in der M-Phase auf zwei Tochterzellen geteilt werden. Wenn einer Zelle in der G1-Phase mitogene Reize wie Wachstumsfaktoren fehlen oder wenn ein Zell-Zell Kontakt erfolgt, gehen die Zellen aus der G1-Phase in einen Zustand der Ruhe über (auch G0 genannt) und hören auf zu proliferieren. Die Gap-Phasen dienen im Zellzyklus zusätzlich als Checkpoints zur Behebung von Schäden an der DNA oder bei der Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen. Insbesondere die G2-Phase dient zur Reparatur von DNA Schäden. Sind die Zellen zu lange in einer dieser Phasen arretiert, so wird infolgedessen die Apoptose dieser Zellen eingeleitet (Gillett und Barnes, 1998). Der Tumorsuppressor p53 kontrolliert dabei die Aufrechterhaltung der Genomintegrität. Als Reaktion auf genotoxischen Stress wird p53 meist durch posttranslationale Modifikation, wie Phosphorylierung (Sakaguchi *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 1999) stabilisiert, kann als Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von Zielgenen modifizieren (Gottlieb und Oren, 1996). Die Aktivierung von p53 durch

Doxorubicin kann dabei sowohl zu einem G1 als auch zu einem G2/M Arrest führen (Lee *et al.*, 2002; Venkatakrisnan *et al.*, 2008). Zusätzlich kann aber auch eine p53 induzierte Apoptose eingeleitet werden (Ravizza *et al.*, 2004). Für p53 zeigte sich auf mRNA Ebene nur eine minimale Veränderung der Expression bei Kurz- und Langzeit Inkubation mit Doxorubicin. Da p53 jedoch hauptsächlich über posttranslationale Modifikationen reguliert wird, wurde zusätzlich die Proteinmenge und die Phosphorylierung an der Stelle Serin392 untersucht. Diese Phosphorylierung führt zu einer Tetramerisierung und Stabilisierung der p53 Proteine und damit zu einer besseren DNA-Bindungskapazität und transkriptionellen Aktivität (Sakaguchi *et al.*, 1997). Bei der Kurzzeit Inkubation zeigte sich eine Zunahme der p53 Gesamtproteinmenge. Zusätzlich dazu konnte eine starke Serin392 Phosphorylierung von p53 durch 5 μ M Doxorubicin gefunden werden. Bei der Langzeit Inkubation dagegen war zwar ebenfalls eine Zunahme der p53 Proteinmenge zu detektieren. Die Phosphorylierung konnte allerdings nur bei einer Konzentration von 1 μ M Doxorubicin gefunden werden. p21 ist ein p53 abhängig regulierter Zellzyklus Inhibitor (Vousden und Lu, 2002). Parallel zu der gefundenen Phosphorylierung von p53 zeigte p21 bei Kurz- und Langzeit Inkubation sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene eine Induktion. Die Aktivierung von p53 und p21 ließ das Vorliegen eines Zellzyklusarrestes vermuten. Die Zellzyklusanalyse konnte diese Vermutung bestätigen. In den Kurzzeit inkubierten Hct-116 Zellen konnte bereits bei einer Konzentration von 1 μ M Doxorubicin ein G2/M Arrest bestimmt werden. Dieser wurde bei 5 μ M noch weiter verstärkt. Auch die 1 μ M Doxorubicin Konzentration bei der Langzeit Inkubation führte zu einem deutlichen G2/M Arrest. Dieser Zellzyklus Arrest war vermutlich p53 abhängig, da er bei den Konzentrationen zu finden war, die zu einer Aktivierung von p53 und p21 führten. Neben dem Arrest in der G2/M Phase und der Aktivierung von p53 und p21 konnten, für die gleichen Konzentrationen an Doxorubicin Veränderungen in der Zellmorphologie detektiert werden. Roninson *et al.* (2001) konnten in Tumorzellen nach DNA Schäden einen Seneszenz ähnlichen Phänotyp identifizieren. Unter Seneszenz versteht man das Altern von normalen Zellen in der Zellkultur. Aufgrund von Verkürzungen der Telomere kommt es zu einem permanenten Arrest der Zellen, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Hayflick und Moorhead, 1961; Harley *et al.*, 1990; Wright und Shay, 2001). Auch Tumorzellen können einen Seneszenz ähnlichen Arrest eingehen. Dieser wird allerdings nicht als replikative Seneszenz bezeichnet,

sondern als beschleunigte Seneszenz, bei der vor allem Schäden an der DNA zur Entwicklung dieses Phänotyps führen (Di Leonardo *et al.*, 1994; Robles *et al.*, 1998). Dieser Seneszenz Phänotyp ist mit einer Vergrößerung und Abflachung der Zellen, einer stärkeren Granularität und einer Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase Bildung verbunden (Roninson *et al.*, 2001). Für die Hct-116 Zellen konnte zumindest die Vergrößerung und die Abflachung der Zellen beobachtet werden. Die Entwicklung eines Seneszenz ähnlichen Phänotyps zusammen mit einem p53 abhängigen Arrest der Zellen in der G2/M Phase konnte bei Kurzzeit Inkubation für 1 und 5 μ M und bei Langzeit Inkubation für 1 μ M gesichert werden. Bei einer Kurzzeit Inkubation der Zellen mit 10 μ M Doxorubicin oder einer Langzeit Inkubation mit 5 und 10 μ M Doxorubicin zeigte sich jedoch in der Zellzyklusanalyse ein völlig anderes Bild. Es konnten keine Zellen mehr in der G2/M Phase detektiert werden. Zusätzlich zeigte sich bei der Langzeit Inkubation durch Abnahme der Zellgröße eine erneute Veränderung der Morphologie. Die Zellzyklusanalyse gibt Anlass zur Deutung, dass die Hct-116 Zellen nach der Inkubation mit Doxorubicin nicht mehr in die G2/M Phase übertreten konnten und permanent in der G1 oder S Phase arretiert sind. Bei allen drei Bedingungen (10 μ M/Kurzzeit, 5 μ M/Langzeit, 10 μ M/Langzeit) hatte sich zuvor gezeigt, dass die untersuchten Transkriptionsfaktoren und Zielgene in der Regel sowohl auf mRNA als auch auf Protein Ebene reprimiert waren. Während der Mitose kommt es vorübergehend zu einem Stop der Transkription. Während dieses Stopps werden Proteine mit kurzen Halbwertszeiten abgebaut und je nach Expressionsmuster können so proapoptotische Mechanismen einfacher eingeleitet werden, da die antiapoptotischen Gegenspieler nicht mehr exprimiert werden (Blagosklonny, 2007). Bei der Kurzzeit Inkubation mit 10 μ M Doxorubicin könnte das der Fall sein. Die Zellen sind in der Interphase arretiert und der Verlust der antiapoptotischen Proteine aufgrund des Transkriptionsarrestes führt zur Aktivierung der Apoptose. Für die Langzeit Inkubation der Zellen passt diese Erklärung allerdings nicht. Hier kam es ebenfalls zu einer Repression sämtlicher gemessener Zielgene und Transkriptionsfaktoren. Über die Zellzyklusanalyse konnte aber kein eindeutiger Arrest festgestellt werden. Vermutlich kommt es zu einem Zustand, bei dem weder eine Transkription noch eine Translation möglich ist und auch, die intrazellulären Signaltransduktionswege nicht mehr aktiviert sind. Die Zellen befinden sich in einem Proliferationsstopp. Ob dieser permanent oder reversibel ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht bewertet werden, da lediglich der

Inkubationszeitraum 24 h betrachtet wurde. Für eine Behandlung von Hct-116 Zellen mit Doxorubicin ist jedoch bereits beschrieben, dass einige Zellen bei längerer Erholungsphase in Doxorubicin freiem Medium wieder begannen sich zu teilen. Allerdings waren diese Zellen in der Regel aneuploid (Sliwinska *et al.*, 2008).

Zusammenfassend lässt sich für die Hct-116 Zellen feststellen, dass eine Kurzzeit Inkubation mit Doxorubicin zu einer dosisabhängigen Induktion der Apoptose führte. Diese wurde vermutlich über die Aktivierung des Protoonkogens c-Myc vermittelt. Für den Transkriptionsfaktor NFAT konnte ebenso wenig eine Bedeutung für die Doxorubicin Wirkung gefunden werden, wie für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Bei einer Inkubation mit 1 und 5 μ M Doxorubicin kam es zusätzlich zur Ausbildung eines Seneszenz ähnlichen Phänotyps und zu einem Arrest der Zellen in der G2/M Phase.

Die Langzeit Inkubation dagegen führte nur mit 1 μ M Doxorubicin zu einer Aktivierung der Apoptose. Diese war vermutlich ebenfalls abhängig von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Myc. Zusätzlich konnte bei dieser Konzentration auch ein G2/M Arrest und ein Seneszenz ähnlicher Phänotyp nachgewiesen werden. Die beiden höheren Konzentrationen dagegen führten zu einem Proliferationsarrest der Zellen, der durch die Repression aller gemessenen Transkriptionsfaktoren und Zielgene gekennzeichnet war. Für diese Konzentration konnten keine toten Zellen nachgewiesen werden. Vermutlich wurden die Zellen durch die konstante Inkubation mit Doxorubicin in diesem Proliferationsstopp arretiert.

4.4 Ausblick II

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Sensitivität von Hct-116 Kolon-Karzinomzellen gegen Doxorubicin. Für die Hct-116 Zellen sollte der Wirkmechanismus im Vergleich zwischen einer kurzen und einer langen Doxorubicin Inkubation untersucht werden. Dabei zeigten sich bei der Kurzzeit Inkubation Befunde, die vielversprechende Ausblicke für die Tumorthherapie erlauben. Mit der Kurzzeitbehandlung konnte eine dosisabhängige Aktivierung der Apoptose erreicht werden. Es kam auch zu einem Zellzyklusarrest, der eindeutig als Arrest in der G2/M Phase zu identifizieren war. Ein Zellzyklus Arrest ist in der Regel zwar eine gute Voraussetzung für die Behandlung von Tumoren. Allerdings können auch arretierte

Zellen noch metabolisch aktiv sein und Proteine sezernieren, die auf umliegende Zellen tumorpromovierend wirken (Roninson *et al.*, 2001). Zum Beispiel durch Gabe des spezifischen p53 Inhibitors Pifithrin (Farah *et al.*, 2007) oder Vitamin C, das die p53 Aktivierung hemmt (Kim *et al.*, 2008), könnte dieser Arrest verhindert werden. Allerdings ist diese Anwendung nur dann von Bedeutung, wenn die Doxorubicin vermittelte Apoptose unabhängig von p53 erfolgen kann. Auch UCN-01, ein Hemmer der Chks, weiterer Kinasen, die den Zellzyklusarrest kontrollieren, wurde bereits in einer klinischen Studie untersucht (Sausville *et al.*, 2001) und könnte dazu führen, dass die Zellen zusätzlich gegen Doxorubicin sensitiviert werden.

Die Inkubation mit Doxorubicin für 24 Stunden führte nur bei der niedrigsten Konzentration zu einer Aktivierung der Apoptose. Bei den höheren Konzentrationen konnte kein Zelltod mehr nachgewiesen werden. Die Zellen waren zwar arretiert, aber die Form des Arrestes konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Es zeigte sich jedoch auch bei der Kurzzeit Inkubation, dass 50 % der Zellen bei der höchsten Doxorubicin Konzentration noch überlebten. In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde daher nach Mechanismen gesucht, die die Hct-116 Kolon-Karzinomzellen gegen die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin zusätzlich sensitivieren können.

4.5 Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Sensitivität

Die FOXO Transkriptionsfaktoren regulieren, wie schon in Kapitel 4.1.3 ausgeführt, eine Vielzahl von Prozessen in den Zellen. Verschiedene Studien haben die Bedeutung der FOXO Transkriptionsfaktoren für die Regulation von Zelltod, Proliferation und Schutz vor oxidativen Schäden gezeigt (Calnan und Brunet, 2008). Sie sind Tumorsuppressoren weil sie als Gegenspieler des PI3K/AKT Signalweges die Einleitung von Apoptose und Zellzyklus Arrest vermitteln (Fu und Tindall, 2008; Ho *et al.*, 2008). In vielen Tumorzellen ist der PI3K/AKT Signalweg konstitutiv aktiviert und FOXO dadurch AKT abhängig inaktiviert. Die Hemmung des AKT Signalweges führt jedoch zu einer Aktivierung von FOXO und zur Induktion von Zellzyklus Arrest und Apoptose in den untersuchten Tumorzellen (Modur *et al.*, 2002; Birkenkamp und Coffey, 2003; Burgering und Medema, 2003; Yang *et al.*, 2005; Sunter *et al.*, 2006). Auch für FOXO4, einen der FOXO Transkriptionsfaktoren, konnte in der Literatur bereits eine Aktivierung von Apoptose und eine Proliferationshemmung nachgewiesen werden. So führte eine Überexpression von FOXO4 in endothelialen Progenitor Zellen (EPCs) zu einer Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bim und zur Bim vermittelten Apoptose (Urbich *et al.*, 2005). Tang *et al.* (2002) konnten nach Überexpression von FOXO4 eine verstärkte Expression des transkriptionellen Repressors Bcl-6 in HeLa Zellen nachweisen. Bcl-6 wiederum führte zur transkriptionellen Repression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xl und ebenfalls zur Apoptose. Neben der Apoptose kann aktives FOXO4 auch einen Zellzyklus Arrest induzieren, indem es den Zellzyklus Inhibitor p27 aktiviert. Dies kann entweder transkriptionell (Medema *et al.*, 2000) oder posttranslational über die Hemmung der AKT Kinase und die Repression von CSN5, eines Proteins, das an der Degradation von p27 beteiligt ist (Yang *et al.*, 2005) erfolgen. Die dadurch erreichte stärkere Expression und Aktivierung von p27 wiederum resultiert in einem Zellzyklus Arrest. Auch ein Schutz gegen DNA Schäden wird über die FOXO Faktoren vermittelt. Durch Induktion von antioxidativen Enzymen wird die Entstehung von DNA Schäden verhindert (Kops *et al.*, 2002). Aber auch DNA Reparatur Gene wie GADD45 können über die FOXO Transkriptionsfaktoren induziert werden (Furukawa-Hibi *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2002). Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Doxorubicin abhängige Regulation des FOXO4 Transkriptionsfaktors und dessen Rolle bei der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität untersucht.

4.5.1 Doxorubicin vermittelte Apoptose und Akkumulation von ROS

Die Doxorubicin Inkubation führte sowohl bei einer Kurzzeit wie auch bei einer Langzeit Inkubation (Abschnitt 4.3) zu einer moderaten Zytotoxizität. Allerdings konnte nur für die Kurzzeit Inkubation eine dosisabhängige Aktivierung der Caspase-3/-7 nachgewiesen werden. Da es in den vorliegenden Untersuchungen um die Rolle von FOXO4 bei der Doxorubicin vermittelten Apoptose ging, wurde deshalb das Kurzzeitschema für die Behandlung der Hct-116 Zellen mit Doxorubicin gewählt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Doxorubicin die Einleitung der Apoptose durch Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges vermitteln kann. Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien kommt es zu einer mitochondrialen Schädigung, die zu einer Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma und zur Aktivierung der intrinsischen Apoptose führt (Wang *et al.*, 2001; Kalivendi *et al.*, 2005). Zusätzlich kann über die Schädigung der Mitochondrien eine verstärkte Expression des Fas Liganden vermittelt werden. Dieser kann wiederum die extrinsischen Apoptose Signalkaskaden über die Caspase-8/-10 aktivieren (Fulda *et al.*, 2000; Kalivendi *et al.*, 2005). In den Hct-116 Zellen bestätigte sich bei der Charakterisierung der Doxorubicin vermittelten Apoptose die dosis-abhängige Aktivierung der Caspase-3/-7. Zusätzlich zeigten die Hct-116 Zellen sowohl eine Aktivierung der Caspase-8/-10 als auch eine leichte Aktivierung der Caspase-9. Die Ergebnisse belegen, dass die Doxorubicin vermittelte Apoptose in den Hct-116 Zellen über den extrinsischen und in geringerem Maß über den intrinsischen Signalweg vermittelt wird.

Für Doxorubicin war aus der Literatur bekannt, dass es als intrazellulärer Redox-Zykler wirkt und zu einem massiven oxidativen Stress in den Zellen führen kann. So wurde die Akkumulation von ROS nach Doxorubicin Inkubation bereits für eine Vielzahl von Zellen wie Kolon-Adenokarzinomzellen, primäre Ratten Hepatozyten, Ratten Hepatomzellen und Prostata Krebszellen gezeigt (Ubezio und Civoli, 1994; Navarro *et al.*, 2006; Chovolou *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte dies auch in den Hct-116 Kolon-Karzinom Zellen bestätigt werden. So führte eine Inkubation mit 5 μM Doxorubicin zu einer signifikanten Akkumulation von ROS über 24 Stunden.

4.5.2 FOXO4 Überexpression, Apoptose und Zellzyklus

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen FOXO4 und Doxorubicin Sensitivität wurden verschiedene Konstrukte zur Überexpression von FOXO4 verwendet. Um auszuschließen, dass die Überexpression von FOXO4 in den Hct-116 Zellen schon basal in Abwesenheit von Doxorubicin einen Zellzyklus Arrest verursachte, wurden die Wachstumsrate und die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen im Vergleich zu Kontrollzellen betrachtet. Die transiente Expression der verschiedenen FOXO4 Proteine in den Hct-116 Zellen hatte praktisch keinen Effekt auf das Wachstum der Zellen. Im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen zeigte sich in der Wachstumskurve lediglich ein leichter Effekt, der auf die Transfektion zurückzuführen war. Auch die Verteilung auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus war in allen Zellpopulationen vergleichbar. Als Zweites sollte ausgeschlossen werden, dass die basale Apoptoserate in den Hct-116 Zellen verändert war. Die Aktivitätsmessung der Effektorcaspase-3/-7 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den FOXO4 überexprimierenden und den Kontrollzellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass im verwendeten Zellkultursystem mit Hct-116 Kolon-Karzinomzellen kein basaler Effekt von FOXO4 auf Proliferation und Apoptose vorlag.

4.5.3 Bedeutung des JNK-Signalweges für den Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Sensitivität

Der Transkriptionsfaktor FOXO4 kann über verschiedene Wege reguliert werden. Ein Mechanismus der FOXO4 Regulation verläuft über eine ROS abhängige Aktivierung der JNK. Die ROS Akkumulation löst eine Ral-abhängigen Aktivierung der JNK aus, welche dann FOXO4 an 2 Stellen (Threonin 447; Threonin 451) phosphorylieren kann (Essers *et al.*, 2004). Diese Phosphorylierung führt zur nukleären Lokalisation und transkriptionellen Aktivierung von FOXO4 (Essers *et al.*, 2004). Für die Hct-116 Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Doxorubicin abhängige Akkumulation von ROS und die Aktivierung der JNK gezeigt werden (siehe 4.5.1). Die Zunahme an intrazellulären ROS korrelierte mit einer zeitabhängigen Phosphorylierung der JNK durch 5 μ M Doxorubicin. Eine Aktivierung der JNK unter Doxorubicin konnte auch durch Zhao *et al.* (2004) in humanen Lungen Adeno-Karzinomzellen gezeigt werden. Um die Rolle dieses Signalweges für die Doxorubicin Wirkung zu untersuchen,

wurden zwei FOXO4 Expressionskonstrukte verwendet. Mithilfe des einen Expressionskonstruktes konnte ein mutantes FOXO4 in den Zellen überexprimiert werden. Bei diesem FOXO4 sind über einen Basenaustausch (Threonin zu Alanin) die beiden JNK-abhängigen Phosphorylierungsstellen (T447 und T451) blockiert (FOXO4JNK-mut). Eine transkriptionelle Aktivierung von FOXO4 über die JNK ist dann nicht mehr möglich (Essers *et al.*, 2004). Das andere Konstrukt wurde für die Expression von wildtypischem FOXO4 verwendet (FOXO4wt(1)) (Essers *et al.*, 2004). Die Funktionalität der beiden Konstrukte konnte über ein Reporterassay gezeigt werden, der die Ergebnisse von Essers *et al.* (2004) bestätigte. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, das drei Kopien der IRS trägt (Fukuoka *et al.*, 2003). Der Vergleich zwischen den beiden FOXO4 Konstrukten zeigte, dass die Mutation der beiden JNK-abhängigen Phosphorylierungsstellen in FOXO4JNK-mut die transkriptionelle Aktivität im Vergleich mit FOXO4wt(1) reprimierte. Es konnte fast keine transkriptionelle Aktivität von FOXO4JNKmut mehr nachgewiesen werden.

Es wurde darauf hin die Hypothese aufgestellt, dass FOXO4 durch den Doxorubicin vermittelten oxidativen Stress über die JNK aktiviert wird und die JNK Aktivierung für die Einleitung des Zelltods verantwortlich ist. Die Überexpression von FOXO4wt(1) führte der Hypothese entsprechend zu einer Sensibilisierung der Hct-116 Zellen gegen den Doxorubicin Stimulus: Die Hct-116FOXO4wt(1) Zellen zeigten einen EC₅₀-Wert von 3 µM Doxorubicin, im Vergleich zu 5 µM Doxorubicin für die Hct-116wt Zellen. Es wurde postuliert, dass die Mutation der beiden Phosphorylierungsstellen für JNK die proapoptotische Wirkung von FOXO4JNK-mut vermindern sollte. Die Überexpression von FOXO4JNK-mut führte allerdings nicht zu der erwarteten Verminderung der Doxorubicin Sensitivität der Hct-116 Zellen. Vielmehr resultierte die Expression von FOXO4JNK-mut in einer mit der Expression von FOXO4wt(1) vergleichbaren Erhöhung der Sensitivität und ebenfalls einem EC₅₀-Wert von 3 µM Doxorubicin. Die JNK-abhängige Regulation von FOXO4 scheint daher für die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin in den Hct-116 Zellen nicht obligat zu sein. Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich vermuten, dass die Beteiligung von FOXO4 an der Doxorubicin Sensibilisierung über einen anderen Signalweg reguliert wird. Neben der JNK-abhängigen Phosphorylierung und Regulation kann die Lokalisation und Aktivität von FOXO4 durch eine

AKT-abhängige inhibitorische Phosphorylierung reguliert werden (Arden, 2006; Weidinger *et al.*, 2008).

4.5.4 Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges für den Einfluss von FOXO4 auf die Doxorubicin Sensitivität

Bei der Sensitivität von Tumorzellen gegen Zytostatika und andere Therapien hat der onkogene PI3K/AKT Signalweg eine große Bedeutung. Die konstante Aktivierung dieses Signalweges führt in Tumorzellen häufig zu einer Resistenz gegen die angewendeten Therapeutika (Testa und Bellacosa, 2001). Nach der Aktivierung der PI3-Kinase kommt es zu einer Aktivierung der AKT Kinase, welche dann eine Vielzahl von Molekülen phosphorylieren und diese dadurch entweder aktivieren oder inhibieren kann. In der Regel werden Aktivatoren für Zelltod und Zellzyklus Arrest inhibiert und Mechanismen der Proliferation aktiviert, sodass dieser onkogene Signalweg mit dem Überleben der Zellen verbunden ist (Manning und Cantley, 2007). Von Bedeutung ist bei diesem Signalweg die AKT vermittelte inhibitorische Phosphorylierung von FOXO4 (Greer und Brunet, 2005). Kommt es in den Zellen zu einer Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges, wird FOXO4 an drei Stellen phosphoryliert (Threonin 28, Serin 193, Serin 258) (Arden, 2006; Weidinger *et al.*, 2008). Diese Phosphorylierung führt zur Bindung von 14-3-3 Proteinen an FOXO4 und zu einer Blockade der FOXO4 DNA Bindung. Zusätzlich unterliegen die FOXO4 Proteine einer Konformationsänderung, die zur Exposition der *nuclear export sequence* (NES) führt. Proteine der Exportmaschinerie binden FOXO4 und sorgen für den Austransport von FOXO4 aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Brunet *et al.*, 2002).

Die Inkubation von Tumorzellen mit dem Zytostatikum Doxorubicin ist häufig mit der Aktivierung genau dieses Signalweges verbunden. Sowohl für verschiedene Mamma-Karzinomzellen (Tari *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005) als auch für Lungen Adeno-Karzinomzellen (Zhao *et al.*, 2004) ist eine Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges und die dadurch vermittelte Resistenz gegen Doxorubicin bereits beschrieben. Auch für Kolon-Karzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass der PI3K/AKT Signalweg in seiner aktiven Form zu einem Schutz der Zellen gegen die Doxorubicin vermittelte Apoptose führte (Abdul-Ghani *et al.*, 2005). Alexia *et al.* (2006) konnten HepG2 Hepatomzellen durch Ko-Inkubation mit Doxorubicin und *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) gegen die Doxorubicin vermittelte

Apoptose schützen. Eine gleichzeitige Inkubation mit einem chemischen Inhibitor der PI3-Kinase (Ly294002) revidierte den Effekt des IGF. Auch für Mamma-Karzinomzellen konnte die Bedeutung des PI3K/AKT Signalweges für die Doxorubicin Sensitivität gezeigt werden. Li *et al.* (2007a) konnten durch Ko-Inkubation von MCF-7 Zellen mit Selen und Doxorubicin eine Aktivierung der Apoptose in Doxorubicin resistenten MCF-7 Zellen induzieren. Dabei zeigte sich, dass das Selen die Doxorubicin vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung der AKT verhinderte. Karzinomzellen des Magen-Darm Traktes und des Kolons, die eine konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges zeigten, wurden mit Wortmannin, einem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor, oder dem PI3K Inhibitor Ly294002 und Doxorubicin inkubiert (Yu *et al.*, 2008; Abdul-Ghani *et al.*, 2005). Die Hemmung der PI3-Kinase erhöhte in beiden Fällen die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität in diesen Karzinomzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden: Auch hier führte die Inkubation der Hct-116 Kolon-Karzinomzellen mit Doxorubicin zu einer dosisabhängigen Phosphorylierung der AKT Kinase. Die Proteinmenge des PI3K/AKT Gegenspielers, des Phosphatase und Tensin Homologs (PTEN), war nicht verändert. Doxorubicin kann zwar *in vitro* im zellfreien System die Aktivität von PTEN reprimieren (Schondorf *et al.*, 2001). Allerdings ist ein direkter Einfluss von Doxorubicin auf die PTEN Proteinmenge in Zellen noch nicht beschrieben worden. Es lässt sich daher vermuten, dass die Aktivierung der AKT nicht über eine Repression des PI3K/AKT Antagonisten PTEN erfolgte, sondern über eine verstärkte Aktivierung der PI3-Kinase oder der AKT Kinase selbst.

Um festzustellen ob auch in den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen der PI3K/AKT Signalweg einen Einfluss auf die Resistenz der Zellen gegen den Doxorubicin Stimulus hatte, wurde ein dominant negatives AKT Konstrukt (DN-AKT) in den Zellen transient überexprimiert. Das dominant negative AKT sollte die Doxorubicin vermittelte Aktivierung der AKT überlagern und die Zellen gegen Doxorubicin sensibilisieren. Bei Betrachtung der Viabilität zeigte sich wie erwartet eine verstärkte Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität in den Hct-116 Zellen, im Vergleich zu nicht transfizierten Hct-116wt Zellen. Die Hct-116wt Zellen besaßen einen EC₅₀-Wert von 3,9 µM Doxorubicin. Die Hemmung des PI3K/AKT Signalweges durch

Überexpression von DN-AKT führte zu einer Erniedrigung des EC_{50} -Wertes auf 2,8 μ M Doxorubicin und bestätigte somit die Erwartungen.

Die Untersuchungen zur Bedeutung des PI3K/AKT Signalweges bei der Doxorubicin Sensitivität in der Literatur beschränken sich meist auf die Betrachtung der Signalkaskaden, die zur Aktivierung der AKT führen (Alexia *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007). Ein AKT regulierter Effektor, der diese Sensibilisierung vermitteln kann, wurde allerdings bis jetzt noch nicht beschrieben. Lediglich Li *et al.* (2007a) postulierten in ihrer Arbeit einen Einfluss des AKT regulierten FOXO3a Transkriptionsfaktors bei der Induktion der Doxorubicin vermittelten Apoptose in den MCF-7 Zellen. Selen verhinderte die Phosphorylierung der AKT und gleichzeitig des AKT Zielproteins FOXO3a. Parallel dazu wurde die Expression des proapoptotischen Proteins Bim und die Doxorubicin vermittelte Apoptose in den MCF-7 Zellen erhöht (Li *et al.*, 2007a). Li *et al.* (2007a) postulierten daher, dass durch die Ko-Inkubation mit Selen AKT nicht Aktiviert und dementsprechen FOXO3a nicht inaktiviert werden kann. FOXO3a kann so die Expression des proapoptotischen Proteins Bim und die Apoptose erhöhen. Yu *et al.* (2008) konnten ebenfalls parallel zum AKT Phosphorylierungsstatus eine Phosphorylierung von FOXO1 und FOXO3a zeigen. Allerdings wurde die Bedeutung dieser beiden Transkriptionsfaktoren für die Doxorubicin vermittelte Apoptose nicht weiter untersucht.

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Darstellung des kausalen Zusammenhangs zwischen FOXO4 Funktion und Doxorubicin Sensitivität. Zunächst wurde der Einfluss von Doxorubicin auf die Phosphorylierung von FOXO4 untersucht. Parallel mit der Doxorubicin vermittelten Phosphorylierung der AKT konnte erwartungsgemäß eine dosisabhängige Phosphorylierung von FOXO4 gefunden werden. Dass diese Phosphorylierung an der Stelle Serin 193 gleichbedeutend mit einem Austransport von FOXO4 aus dem Zellkern in das Zytoplasma war, konnte anhand der FOXO4 Mengen in zytosolischer und nukleärer Fraktion gezeigt werden. Die nukleäre FOXO4 Menge nahm dosisabhängig ab. Im Zytoplasma dagegen akkumulierte mit steigender Doxorubicin Dosis die Menge an FOXO4.

Um herauszufinden, ob diese Phosphorylierung von FOXO4 tatsächlich AKT-abhängig war, wurden die Hct-116 Zellen erneut mit dem DN-AKT Konstrukt transient überexprimiert. Die Hct-116wt Zellen zeigten wie erwartet die Doxorubicin

vermittelte Phosphorylierung von AKT und FOXO4 und einen Austransport von FOXO4 aus dem Zellkern. Im Gegensatz dazu konnte durch Überexpression von DN-AKT die AKT Phosphorylierung unterdrückt werden. Gleichzeitig war die Phosphorylierung von FOXO4 stark reduziert. Das hypophosphorylierte FOXO4 verblieb im Zellkern. In den Hct-116 Zellen zeigte sich nach Doxorubicin Inkubation also neben der AKT Aktivierung auch die inhibitorische Phosphorylierung von FOXO4.

Mit der Überexpression von DN-AKT konnten die Hct-116 Zellen wie oben dargestellt gegen den Doxorubicin Stimulus sensibilisiert werden. Um herauszufinden, ob der AKT-abhängige Aktivierungsstatus von FOXO4 für die Sensibilisierung der Zellen gegen Doxorubicin verantwortlich ist, wurde in den Hct-116 Zellen wildtypisches FOXO4 (FOXO4wt(2)) überexprimiert (Matsuzaki *et al.*, 2005a). Zum anderen sollte der FOXO4 Transkriptionsfaktor von der durch Doxorubicin induzierten inhibitorischen AKT Phosphorylierung entkoppelt werden. Dazu wurde ein FOXO4 Mutationskonstrukt verwendet, das durch Basenaustausch (Serin und Threonin zu Alanin) an den AKT Phosphorylierungsstellen nicht mehr durch die AKT phosphoryliert werden konnte (FOXO4nukleär) und somit konstitutiv aktiv im Zellkern vorliegt (Matsuzaki *et al.*, 2005a). Die Funktionalität der beiden Konstrukte konnte über das 3xIRS-Reporterassay gezeigt werden. Die transiente Überexpression von FOXO4wt(2) und FOXO4nukleär führte zu einer transkriptionellen Aktivierung dieses Reportergenkonstruktes. Die transkriptionelle Aktivität des FOXO4nukleär war dabei im Vergleich zu der des FOXO4wt(1) wie erwartet doppelt so stark. Mithilfe von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) FOXO4 Fusionsproteinen konnte die Lokalisation der beiden FOXO4 Proteine zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Während EGFP-FOXO4wt(1) eine intermediäre Verteilung auf Zytoplasma und Zellkern zeigte, war EGFP-FOXO4nukleär ausschließlich im Zellkern lokalisiert.

Um die Bedeutung des FOXO4 Aktivitätszustandes für die Doxorubicin Zytotoxizität zu ermitteln, wurden die beiden FOXO4 Proteine in den Hct-116 Zellen überexprimiert und die Zellen darauf folgend mit Doxorubicin inkubiert. Die Überexpression von FOXO4wt(2) und FOXO4nukleär führte zu einer Sensibilisierung der Zellen gegen Doxorubicin. Der EC_{50} -Wert für die Hct-116FOXO4wt(2) Zellen lag bei 3,3 μ M im Vergleich zu 4,3 μ M in den Hct-116wt Zellen. Die Expression des

konstitutiv aktiven FOXO4nukleär erniedrigte den EC_{50} -Wert zusätzlich auf 2,6 μ M. Parallel zu den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen wurde FOXO4wt(2) auch in HepG2 Hepatomzellen überexprimiert und die Sensitivität der Zellen für Doxorubicin untersucht. Die HepG2 Zellen zeigten nach Expression von FOXO4wt(2) ebenfalls eine erhöhte Sensitivität bei Inkubation mit Doxorubicin. Diese Ergebnisse beweisen, dass FOXO4 eine Funktion bei der Induktion des Doxorubicin vermittelten Zelltods besitzt. Dieser Effekt ist nicht auf Kolon-Karzinomzellen beschränkt, sondern lässt sich auch auf Hepatomzellen übertragen.

Bereits die Expression des regulierbaren FOXO4wt(2), nicht nur die des konstitutiv aktiven FOXO4nukleär führte in den Hct-116 Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Doxorubicin Zytotoxizität gegenüber den Wildtypzellen. Es wurde angenommen, dass aufgrund der Überexpression die Zellen mit FOXO4 „geflutet“ sind und daher auch eine größere Menge an FOXO4 im Zellkern aktiv vorliegt. Es stellte sich heraus, dass die Hct-116FOXO4wt(2) Zellen tatsächlich eine größere Menge an nukleär lokalisiertem FOXO4 besaßen als die Hct-116wt Zellen. Zusätzlich war die Inkubation mit 5 μ M Doxorubicin nicht effektiv genug, um in den Hct-116FOXO4wt(2) Zellen einen Austransport von FOXO4 aus dem Zellkern zu aktivieren. Die Überexpression von FOXO4wt(2) führte trotz Doxorubicin Inkubation daher tatsächlich zu einer erhöhten im Zellkern lokalisierten FOXO4 Menge, was die im Vergleich zu den Hct-116wt Zellen verstärkte Doxorubicin Zytotoxizität erklärt.

Um herauszufinden, ob die erhöhte Zytotoxizität in den Hct-116FOXO4nukleär Zellen mit einem apoptotischen Zelltod assoziiert ist, wurde die Aktivierung der Caspase-3/-7 im Vergleich zwischen den Hct-116wt und Hct-116FOXO4nukleär Zellen gemessen. Die Expression von konstitutiv aktivem FOXO4nukleär führte zu einer doppelt so starken Aktivierung der Caspasen-3/-7. In den Hct-116 Zellen konnte FOXO4 demnach als wichtiger Mediator für den apoptotischen Zelltod nach Inkubation mit Doxorubicin identifiziert werden. Abhängig vom Status des PI3K/AKT Signalweges kann FOXO4 im Zellkern seine Aktivität als Tumorsuppressor ausüben und die Apoptose induzieren.

FOXO4 vermittelt seine Wirkung in den Zellen durch die Regulation der Transkription verschiedener Zielgene. Um mögliche proapoptotische Faktoren zu identifizieren, die an dem Effekt von FOXO4 beteiligt sind, wurde die Expression von

charakteristischen Zielgenen nach Überexpression der FOXO4 Konstrukte im Vergleich zu den Hct-116wt Zellen untersucht. Die FOXO Faktoren haben ein breites Spektrum an Zielgenen. Nach Kerntranslokation aktiviert FOXO4 die Transkription des proapoptotischen Proteins Bim in endothelialen Progenitor Zellen (EPCs). Diese verstärkte Expression führte in den EPCs zu einer Aktivierung der Apoptose (Urbich *et al.*, 2005). Auch in Podozyten der Maus konnte eine FOXO4 abhängige Aktivierung der Bim Expression nachgewiesen werden (Chuang *et al.*, 2007). Der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor p21 wird in Keratinozyten über alle drei FOXO Faktoren reguliert (Seoane *et al.*, 2004). Für das antiapoptotische Protein Bcl-xl ist in HeLa Zellen eine indirekte Regulation nachgewiesen worden. Die FOXO Faktoren aktivieren den transkriptionellen Repressor Bcl-6, der wiederum die Expression von Bcl-xl reprimiert (Tang *et al.*, 2002). Auch das antioxidative Enzym Katalase kann transkriptionell über FOXO4 reguliert werden. Nach Akkumulation von ROS in den Zellen kommt es zu einer FOXO4-abhängigen Aktivierung der Katalase Expression. Diese fungiert dann in einem negativen Feedback als Inaktivator der ROS, sodass der FOXO4 aktivierende Stimulus abgebaut wird (Essers *et al.*, 2004).

Die Inkubation mit 5 μ M Doxorubicin resultierte sowohl in den Wildtypzellen als auch in den mit den verschiedenen FOXO4 Konstrukten transfizierten Zellen in einer Induktion von Bim, Bcl-xl und p21 auf mRNA Ebene. Die mRNA Expression der Katalase war nach Inkubation mit 5 μ M Doxorubicin reprimiert. Für keines der untersuchten Zielgene konnte ein direkter regulatorischer Effekt von FOXO4 ausgemacht werden. Die Auswahl von Zielgenen umfasste daher unter Umständen nicht das richtige Target. Das Spektrum der durch FOXO regulierten Zielgene ist groß. Es können z. B. weitere proapoptotische Faktoren induziert werden. Brunet *et al.* (1999) konnten eine Regulation der Expression des Fas Liganden (FasL) nach Aktivierung von FOXO3a nachweisen. Die Induktion von FasL wiederum führte zur Aktivierung einer FasL vermittelten Apoptose. Für die Hct-116 Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Expression von FasL nach Doxorubicin Inkubation überprüft. Allerdings konnte keine Expression von FasL in den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen nachgewiesen werden. Ryan *et al.* (2006) fanden für Hct-116 Zellen und weitere Tumorzelllinien heraus, dass die mRNA Expression von FasL über einen Zeitraum von 72 h stark variierte. So konnten sie in den Hct-116 Zellen nur an drei von dreizehn gemessenen Zeitpunkten eine detektierbare FasL Expression zeigen. Auf Proteinebene konnte jedoch eine konstante Expression von

FasL nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass für eine Aussage über FasL als FOXO4 Target eine weitere Charakterisierung auf Proteinebene nötig gewesen wäre.

Ein weiteres Target von FOXO4 könnte die AKT Kinase selbst sein. Yang *et al.* (2005) konnten in NIH3T3 Zellen (embryonalen Fibroblasten der Maus) zeigen, dass durch Expression einer konstitutiv im Kern lokalisierten FOXO4 Mutante die Phosphorylierung und Aktivierung der AKT Kinase reprimiert wurde. Weder die Aktivität der PDK1 noch die PTEN Expression waren durch die Expression der FOXO4 Mutante betroffen. Allerdings wurde durch die geringere Phosphorylierung von AKT die inhibitorische Phosphorylierung von AKT regulierten Proteinen wie p27 verhindert. FOXO4 vermittelte dadurch in diesem System einen posttranslationalen Effekt auf p27 (Yang *et al.*, 2005). In den Hct-116 Zellen wurde die Wirkung der FOXO4 Expression auf die AKT Kinase nicht untersucht. Das Vorliegen eines solchen Effektes könnte zum einen einen positiven Feedback Mechanismus für FOXO4 selbst bedeuten, da durch die Inaktivierung der AKT FOXO4 länger im Zellkern aktiv bleiben könnte. Zum anderen könnten andere proapoptotische Faktoren (z. B. Caspase-9) gegen die inhibitorische Phosphorylierung durch AKT geschützt werden.

Abhängig von der zellulären Ausstattung mit anderen Transkriptionsfaktoren und möglichen Bindungspartnern können die FOXO Transkriptionsfaktoren neben der DNA Bindung auch Effekte als Ko-Aktivatoren ausüben (van der Vos und Coffey, 2008). Ramaswamy *et al.* (2002) konnten erstmals an humanen Nieren Karzinomzellen und Osteosarkomzellen zeigen, dass ein für die DNA Bindung mutiertes FOXO1 trotzdem einen Zellzyklus Arrest hervorrufen konnte. Der gleiche Versuch in humanen Prostata Adeno-Karzinomzellen, in denen FOXO3a im aktiven Zustand Apoptose induziert, führte jedoch nicht zu einer Aktivierung von FOXO3a Zielgenen, wenn die DNA Bindedomäne von FOXO3a mutiert war. Die Ko-Aktivator Wirkung war auf FOXO1 und die Regulation der Proliferation beschränkt (Ramaswamy *et al.*, 2002).

FOXO Faktoren können zusätzlich die Wirkung des Onkogens c-Myc beeinflussen. Bei einer Aktivierung von FOXO3a konnte die Induktion eines Teils der c-Myc abhängigen Gene für die Proliferation und Transformation von Tumorzellen verhindert werden (Bouchard *et al.*, 2004). Interaktionen im Zellkern sind außerdem

mit den Sirtuinen möglich. Acetylierung durch die Histon-Acetyltransferase CREB-binding protein (CBP) hemmt bei oxidativem Stress die transkriptionelle Aktivität von FOXO4. Die Acetylierung ist jedoch reversibel und kann durch die NAD⁺ abhängige Deacetylase SIRT1 abgebaut werden. FOXO4 kann danach wieder als transkriptioneller Regulator fungieren. SIRT1 wird als Faktor bei der Vermittlung der Stressresistenz und der Lebensdauer betrachtet. In Übereinstimmung damit führt die Reaktivierung von FOXO4 in erster Linie zur Expression von Schutzmechanismen gegen den intrazellulären Stress (Giannakou und Partridge, 2004; van der Horst *et al.*, 2004).

Yamamura *et al.* (2006) zeigten, dass in Karzinomzellen des Magen-Darm Traktes und in embryonalen Maus Fibroblasten die Expression des proapoptotischen Proteins Bim durch den Transkriptionsfaktor RUNX3, der in Karzinomzellen des Magen-Darm Traktes die Proliferation inhibiert und die Apoptose induziert, nur nach Bindung an FOXO3a induziert werden konnte. Diese Literaturstellen zusammen genommen belegen, dass neben der transkriptionellen Regulation über direkte DNA Bindung noch andere Mechanismen existieren, über die FOXO4 im Zellkern seine apoptotische Wirkung vermitteln kann. Für das vorliegende Testsystem mit Hct-116 Zellen kann über mögliche Interaktionspartner von FOXO4 im Zellkern allerdings nur spekuliert werden.

Da für keins der FOXO4 Konstrukte ein Einfluss auf die untersuchten Zielgene gefunden wurde, wurde die Funktionalität der Konstrukte zusätzlich zu dem Funktionalitätstest mit dem artifiziellen 3xIRS Promotor auch mit dem Selenoprotein P Promotor getestet. Dieser in den Zellen physiologisch vorliegende Promotor wurde von Walter *et al.* (2008) ebenfalls als Ziel von FOXO Transkriptionsfaktoren identifiziert. Der Promotor trägt zwei FOXO abhängige Bindestellen, die eine direkte Regulation des Selenoproteins P in Abhängigkeit vom PI3K/AKT/FOXO Signalweg vermitteln können. Die Expression von FOXO4wt(1) und FOXO4wt(2) führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Aktivierung des Selenoprotein P Promotors. Das für die JNK-abhängige Phosphorylierung mutante FOXO4 Protein führte ebenfalls zu einer Aktivierung des Promotors. Diese war zwar wie erwartet schwächer als die durch FOXO4wt(1) vermittelte Aktivierung. Allerdings wurde festgestellt, dass die Aktivierung des Selenoprotein P Promotors, im Gegensatz zum zuvor verwendeten artifiziellen 3xIRS Promotor, nicht komplett unterdrückt, sondern nur um 50%,

reduziert war. Die Expression des konstitutiv aktiven FOXO4_{nukleär} führte im Vergleich zu FOXO4_{wt(2)} wie erwartet zu einer doppelt so starken transkriptionellen Aktivierung des Selenoprotein P Promotors. Aus dem Reporter-genversuch wird zumindest klar, dass alle überexprimierten FOXO4 Konstrukte in den Hct-116 Zellen funktionell aktiv sind und die Überexpression zu einer transkriptionellen Aktivierung führen kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutation der JNK abhängigen Phosphorylierungsstellen nicht ausreichend war, um die Aktivierung von FOXO4 zu hemmen. Die verbleibende transkriptionelle Aktivität von FOXO4 war ausreichend um den gleichen Effekt auf die Doxorubicin Zytotoxizität hervorzurufen wie FOXO4_{wt(1)}. Dieser Befund erklärt noch einmal, warum der ROS aktivierte JNK/FOXO4 Weg keinen Einfluss auf die Doxorubicin Sensitivität hatte: Die Abhängigkeit der FOXO4 Regulation von dem PI3K/AKT Signalweg war stärker als die von dem JNK Signalweg.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die ROS vermittelte JNK-abhängige Regulation von FOXO4 in dieser Arbeit kein Bezug zur Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität hergestellt werden konnte. Die Regulation von FOXO4 über den PI3K/AKT Signalweg ist jedoch von fundamentaler Bedeutung für die Sensitivität der Krebszellen gegen Doxorubicin. In Abbildung 2 ist der Einfluss von Doxorubicin auf den PI3K/AKT Signalweg und auf FOXO4 in den Hct-116 Kolon-Karzinomzellen in der Übersicht dargestellt. Die aus der Literatur bereits bekannte schützende Rolle des PI3K/AKT Signalweges konnte für die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität bestätigt werden. Doxorubicin vermittelt in den Zellen die Phosphorylierung und Aktivierung der AKT Kinase. Daraus folgend wird das AKT Zielmolekül FOXO4 phosphoryliert, aus dem Kern ausgeschleust und so inaktiviert. Die Zellen können proliferieren und es kommt nur in geringem Maße zur Einleitung einer Doxorubicin vermittelten Apoptose. Wird der PI3K/AKT Signalweg gehemmt, kann FOXO4 im Kern verbleiben und Apoptose induzieren. Die Erhöhung der FOXO4 Expression und damit des FOXO4 Anteils im Kern sensibilisierte die Hct-116 Zellen ebenso für Doxorubicin wie die Überexpression eines konstitutiv aktiven FOXO4. Auch in HepG2 Zellen konnte eine Sensibilisierung gegen Doxorubicin durch Überexpression von FOXO4 erreicht werden. Wie Doxorubicin die Induktion der Apoptose in den Hct-116 Zellen vermittelt, konnte allerdings nicht festgestellt werden. Charakteristische FOXO Zielgene zeigten auf Transkriptebene keine FOXO4-abhängigen Veränderungen in ihrer Expression. Es kann daher nur angenommen werden, (1) dass ein unbekannter

Faktor X (ein proapoptotisches Protein, das hier nicht identifiziert werden konnte) über FOXO4 transkriptionell reguliert wird. Nach Lokalisation von FOXO4 in den Zellkern wird dieser Faktor induziert. Durch die Induktion kann die Apoptose stärker aktiviert werden. (2) Andererseits könnte FOXO4 auch als Ko-Aktivator für einen Faktor X in den Zellen fungieren, der ebenfalls durch Doxorubicin aktiviert wird. Erst nach Aktivierung und Kerntranslokation von FOXO4 käme es durch die Ko-Lokalisation von FOXO4 und dem Faktor X zu der gemessenen Aktivierung der Apoptose. (3) Eine dritte Möglichkeit wäre eine hemmende Wirkung von FOXO4 auf

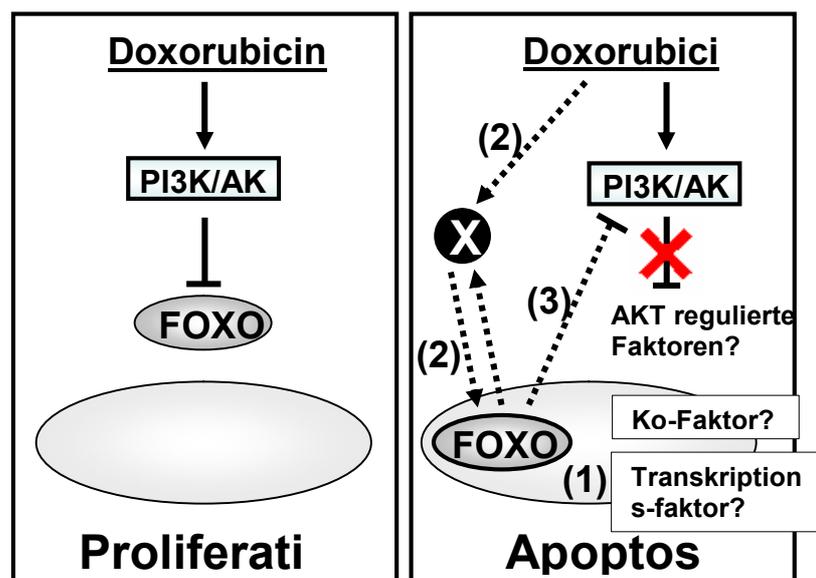


Abb.2: Regulation von PI3K/AKT und FOXO4 in Abhängigkeit von Doxorubicin.

Die Inkubation mit Doxorubicin führt zu einer Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges und einer Inaktivierung von FOXO4. Ist FOXO4 konstitutiv aktiv im Kern lokalisiert, kommt es zu einer Induktion der Apoptose. Diese kann durch: (1) durch transkriptionelle Aktivierung von FOXO4 abhängigen, proapoptotischen Genen, (2) durch Bindung von FOXO4 als Ko-Faktor an einen unbekanntes Faktor X und dessen dadurch verstärkte proapoptotische Wirkung, (3) durch FOXO4 abhängige Hemmung der AKT Phosphorylierung und daraus folgender Aktivierung anderer proapoptotischer AKT Zielmoleküle; vermittelt werden.

den PI3K/AKT Signalweg. FOXO4 könnte auf transkriptioneller Ebene die Expression von an diesem Weg beteiligten Faktoren regulieren. So könnten weitere an der Apoptose beteiligte Proteine, die wie FOXO nach Phosphorylierung durch die AKT inaktiviert vorliegen, aktiviert werden. Angesichts der „klassischen“ Funktion von FOXO4 als Transkriptionsfaktor erscheinen die Möglichkeiten (1) und (3), die beide auf der transkriptionellen Aktivität von FOXO4 beruhen am wahrscheinlichsten.

4.6 Ausblick III

Die Ergebnisse aus dem dritten Teil dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass FOXO4 als Tumorsuppressor fungiert. Die hier gefundene proapoptotische Wirkung von FOXO4 bei der Doxorubicin vermittelten Apoptose könnte als Ansatzpunkt für die

Entwicklung neuer Behandlungsmethoden von Tumoren dienen. Durch die Entkopplung von FOXO4 und unter Umständen auch der anderen FOXOs vom PI3K/AKT Signalweg und ihre daraus folgende Aktivierung, könnten Tumorzellen gegen exogene Stimuli sensibilisiert werden. Schon bei niedrigeren Chemotherapeutika Konzentrationen könnte so eine verstärkte Einleitung der Apoptose erreicht werden. In Mäusen konnte z. B. das Wachstum von Tumoren, die durch Expression des Rezeptor Tyrosin Kinase Onkogens HER2 proliferierten, durch Expression von konstitutiv aktivem FOXO4 verhindert werden (Yang *et al.*, 2005). Die geringeren erforderlichen Konzentrationen an Chemotherapeutika hätten den Vorteil, dass auch die unspezifischen Nebenwirkungen, wie im Falle des Doxorubicins die Kardiotoxizität (Minotti *et al.*, 2004), reduziert werden könnten. Allerdings muss für die Übertragbarkeit auf die klinische Situation der genaue Wirkmechanismus des FOXO4 Transkriptionsfaktors bei der Doxorubicin vermittelten Apoptose weiter untersucht werden. Das Expressionsmuster von FOXO4 regulierten Genen in den Zellen sollte Aufschluss über die detaillierten proapoptotischen Wirkungsmechanismen von FOXO4 geben und zur Identifizierung von weiteren FOXO4 abhängigen Genen führen. Zusätzlich darf nicht vernachlässigt werden, dass in den Tumorzellen neben dem PI3K/AKT Signalweg weitere Regulationsmechanismen vorliegen, die an der Apoptose beteiligt sind. FOXO4 kann darüber hinaus, neben der Apoptose auch andere zelluläre Mechanismen wie den Metabolismus regulieren.

Ein erst kürzlich aufgezeigter Unterschied zwischen einer akuten und einer chronischen Aktivierung der FOXO Faktoren ist ebenfalls nicht zu vernachlässigen. Während die akute Aktivierung der FOXOs ihre Rolle als Tumorsuppressoren bestätigt, konnte in Doxorubicin resistenten Leukämiezellen eine chronische Aktivierung von FOXO3a gefunden werden, die mit dem Schutz der Zellen gegen den Doxorubicin Stimulus verbunden war (Gomes *et al.*, 2008). FOXO3a, ein weiteres Mitglied der Gruppe der FOXO Transkriptionsfaktoren, induziert bei seiner Aktivierung ebenfalls Zellzyklus Arrest und Apoptose (Yang *et al.*, 2005). In chronisch myeloischen Leukämiezellen (CML), die eine Resistenz gegen Doxorubicin entwickelt hatten, konnten allerdings schützende Effekte von FOXO3a gefunden werden. Die resistenten Zellen wiesen eine konstitutive Aktivierung von FOXO3a auf, die zu einer Induktion des ABCB1 Transporters führte und unabhängig von der Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges war. Durch die Induktion des Transporters

konnte das Doxorubicin schneller aus den Zellen ausgeschleust werden (Hui *et al.*, 2008b). In einer zweiten Versuchsreihe konnte FOXO3a den PI3K/AKT Signalweg über direkte Regulation der Expression der katalytischen Untereinheit p110 α der PI3-Kinase aktivieren. Durch die FOXO3a vermittelte Aktivierung der AKT kam es zu einem Schutz der Zellen gegen das Chemotherapeutikum (Hui *et al.*, 2008a). Gomes *et al.* (2008) vermuten, dass es durch posttranslationale Modifikationen von FOXO3a zu einer Entkopplung vom PI3K/AKT Signalweg und zu der chronischen Aktivierung von FOXO3a kommt. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht aufgeklärt. Diese zu den Ergebnissen dieser Arbeit gegensätzliche Wirkung des aktiven FOXO macht deutlich, dass wie in dieser Arbeit gezeigt eine akute, transiente Aktivierung von FOXO proapoptotisch wirken kann. Im Gegensatz dazu führt die chronische Aktivierung zu einem Schutz der Zellen. Aus den beiden Beispielen wird klar, dass alle Wirkmechanismen der FOXO Transkriptionsfaktoren in der Tumor Behandlung aufgeklärt werden müssen, bevor eine Umsetzung in der Klinik möglich ist.

5.1 Zusammenfassung

Für die Aufrechterhaltung von Regulationsprozessen in Zellen ist eine physiologische Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies von zentraler Bedeutung. Insbesondere H_2O_2 dient aufgrund seiner Membranpermeabilität als wichtiger *second messenger* für die Regulation von Signaltransduktionswegen und redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren. Das intrazelluläre Niveau an H_2O_2 wird unter anderem über das antioxidative Enzym Katalase moduliert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des intrazellulären Redox-Status für die Aktivität redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren und Signalwege bei der Sensibilisierung von Krebszellen untersucht. Die H_2O_2 Menge wurde in MCF-7 Mamma-Karzinomzellen und Hct-116 Kolon-Karzinomzellen mithilfe zweier pro-oxidativer Substanzen (TNF- α und Doxorubicin) und transienter Überexpression des antioxidativen Enzyms Katalase moduliert. Es wurde gezeigt, dass in MCF-7 Zellen die Zytotoxizität von TNF- α entscheidend von der intrazellulären Menge an H_2O_2 abhängt. So führte eine Überexpression der Katalase in MCF-7kat Zellen zu einer signifikanten Verstärkung der TNF- α vermittelten Zytotoxizität und Apoptose. Gleichzeitig konnte der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NF- κB in den MCF-7kat Zellen nur kurz transient aktiviert werden. Durch eine Bolusgabe von H_2O_2 wurde die NF- κB Aktivierung verlängert. Dies zeigt, dass die unzureichende Dauer der NF- κB Aktivierung durch das Fehlen des *second messengers* H_2O_2 verursacht wurde. Die zentrale Rolle von H_2O_2 bei der Zytotoxizität von TNF- α wurde durch die Ergebnisse an MCF-7wt Zellen zusätzlich verdeutlicht. Dort führte die Behandlung mit TNF- α zu einer lang anhaltenden, konstanten Aktivierung von NF- κB , die mit einer Reduktion der Katalase Expression und gleichzeitiger Induktion der MnSOD Expression einherging. Die differenzielle Regulation dieser beiden antioxidativen Enzyme resultierte in einer gesteigerten intrazellulären H_2O_2 Konzentration und somit in einer ausreichenden Aktivierung der protektiven NF- κB Signalkaskade.

Ein weiterer durch H_2O_2 regulierter redox-sensitiver Transkriptionsfaktor ist FOXO3a, ein Mitglied der FOXO Superfamilie. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Katalase und somit die Verringerung der intrazellulären H_2O_2 Menge zu einem nukleären Export von FOXO3a führte. Der enge Zusammenhang zwischen Katalase Expression und FOXO3a Aktivität wurde dadurch unterstrichen, dass es nach Überexpression von FOXO3a zu einer Erhöhung der Katalase Expression in den MCF-7 Zellen kam. Die TNF- α vermittelte Repression der Katalase und die damit verbundene gesteigerte H_2O_2 Konzentration in den MCF-7wt Zellen ging mit einem nukleären Export von FOXO3a einher. In den MCF-7kat Zellen mit verminderter intrazellulärer H_2O_2 Konzentration kam es dagegen zu einem nukleären Import von FOXO3a. Eine Überexpression von konstitutiv aktivem FOXO3a führte zu einer Erhöhung der TNF- α Zytotoxizität in den MCF-7 Zellen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Regulation von FOXO3a in Abhängigkeit von

der intrazellulären H_2O_2 Konzentration erfolgt und, dass FOXO3a über die Regulation der Katalase selbst Einfluss auf den Redox-Status der MCF-7 Zellen nimmt. Da im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, dass für die Aktivierung von NF- κ B eine ausreichende Menge an intrazellulärem H_2O_2 benötigt wird, könnte über den hier skizzierten Weg die erhöhte TNF- α Zytotoxizität in den FOXO3a überexprimierenden MCF-7 Zellen erklärt werden.

Das Zytostatikum Doxorubicin wird häufig in der Therapie von soliden Tumoren verwendet und kann unter anderem als intrazellulärer Redox-Zykler zu einer Akkumulation von ROS in den Zellen führen. Aus diesem Grund wurde die Rolle von H_2O_2 bei der Doxorubicin vermittelten Zytotoxizität und Regulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren in Hct-116 Kolon-Karzinomzellen untersucht. Doxorubicin führte zu einer Akkumulation von ROS und zu einer Repression der Katalase Expression. Im Gegensatz zur TNF- α Schädigung führte der beschleunigte Abbau von intrazellulärem H_2O_2 durch die Überexpression der Katalase jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zytotoxizität von Doxorubicin. Eine Kurzzeit Inkubation (3 h) bedingte einen p53 und p21 abhängigen G2/M Arrest und daraus folgend eine dosisabhängige Apoptose, die vermutlich c-Myc abhängig reguliert wurde. Eine Inkubation für 24 h dagegen resultierte in einem Stopp der Transkription und Translation und einem Arrest der Zellen vor dem Eintritt in die G2/M-Phase. FOXO4, ein weiteres redox-sensitives Mitglied der FOXO Superfamilie, das Zellzyklus Arrest und Apoptose reguliert, kann durch eine JNK abhängige Phosphorylierung aktiviert werden. In Hct-116 Zellen hatte die JNK Aktivierung jedoch keinen Effekt auf die FOXO4 Aktivität und die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität. Dagegen konnte der PI3K/AKT/FOXO4 Signalweg mit der Doxorubicin Zytotoxizität verknüpft werden. So wurde gezeigt, dass die AKT Kinase in den Hct-116 Zellen Doxorubicin abhängig aktiviert wird und dies zu einer Phosphorylierung und einem nukleären Export von FOXO4. In der vorliegenden Arbeit konnte auf diesen Ergebnissen aufbauend eine Sensibilisierung der Hct-116 Zellen gegenüber Doxorubicin erzielt werden. Eine Überexpression von FOXO4 selbst oder einer dominant-negativen AKT erhöhte die Doxorubicin vermittelte Zytotoxizität und Apoptose. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Hemmung des PI3K/AKT Signalweges oder die Aktivierung des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors FOXO4 als Ansatzpunkte für die Sensibilisierung von Krebszellen gegenüber Zytostatika betrachtet werden können.

5.2 Summary

Physiological amounts of intracellular reactive oxygen species (ROS) are of great importance to maintain proper functions of redox-signaling processes. Particularly H_2O_2 , due to its membrane permeating properties, serves as a second messenger for regulation of signaling transduction pathways and redox-sensitive transcription factors. Maintenance of intracellular redox homeostasis is in part mediated by enzymatic antioxidant systems. In particular intracellular levels of H_2O_2 can be reduced by the antioxidant enzyme catalase the major H_2O_2 -scavenging enzyme in the cells. In the present study the impact of cellular redox state on regulation of redox-sensitive signaling pathways was investigated with regard to sensitizing cancer cell. Modulation of intracellular redox state in MCF-7 breast carcinoma and Hct-116 colon carcinoma cells was carried out using two pro-oxidative compounds (TNF- α and Doxorubicin) and transient overexpression of antioxidant enzyme catalase. For MCF-7 cells a clear connection between TNF- α mediated cytotoxicity and intracellular amounts of H_2O_2 was shown. Catalase overexpression in MCF-7kat cells resulted in increased TNF- α mediated cytotoxicity and apoptosis. Concurrently, redox-sensitive transcription factor NF- κB showed only transient activation in MCF-7kat cells. This was due to a lack of sufficient H_2O_2 to co-stimulate NF- κB activation as demonstrated by the observation that addition of exogenous H_2O_2 led to a second increase of NF- κB activity. Results for MCF-7wt cells further supported the crucial role of H_2O_2 in TNF- α mediated cytotoxicity. TNF- α treatment of MCF-7wt cells elicited sustained NF- κB activation which was accompanied by downregulation of catalase and induction of MnSOD expression. These results indicate that TNF- α mediated differential regulation of MnSOD and catalase in MCF-7wt cells and accordingly, elevated levels of H_2O_2 are required for appropriate function of the NF- κB dependent survival pathway.

FOXO3a, a member of the FOXO superfamily, is another redox-sensitive transcription factor which can be regulated in a H_2O_2 dependent way. In the present study reduction of intracellular H_2O_2 levels by overexpressing catalase, resulted in nuclear exclusion of FOXO3a. Overexpression of FOXO3a caused an increased catalase expression which further supported the close connection between FOXO3a activity and catalase expression in MCF-7 cells. TNF- α mediated downregulation of catalase expression and subsequent accumulation of H_2O_2 in MCF-7wt cells was accompanied by nuclear exclusion of FOXO3a. In contrast, MCF-7kat cells with insufficient intracellular amounts of H_2O_2 showed nuclear import of FOXO3a after TNF- α treatment. Additionally, overexpression of constitutive active FOXO3a enhanced TNF- α mediated cytotoxicity. These results suggest that regulation of redox-sensitive transcription factor FOXO3a is dependent on intracellular amounts of H_2O_2 . Furthermore, intracellular redox state itself can be modulated by a FOXO3a dependent regulation of the antioxidant enzyme catalase. Since the first part of this study showed that

sufficient amounts of intracellular H_2O_2 are a necessity for functional activation of NF- κ B, the outlined FOXO3a catalase signaling could account for heightened TNF- α mediated cytotoxicity in FOXO3a overexpressing cells.

The cytostatic drug Doxorubicin which is often used in treatment of solid tumors can among others function as a redox cyler and induce accumulation of ROS. Therefore, the second part of this study investigated the role of H_2O_2 in regulating redox-sensitive transcription factors and its connection to doxorubicin mediated cytotoxicity in Hct-116 colon carcinoma cells. Doxorubicin treatment resulted in accumulation of ROS and downregulation of catalase expression. However, contrary to our results with TNF- α accerelated decomposition of H_2O_2 by overexpressing catalase had no effect on doxorubicin mediated cytotoxicity. Short time (3h) doxorubicin incubation resulted in p53 and p21 dependent G2/M arrest and subsequent apoptosis which was likely to be c-Myc dependent. In contrast, 24 h incubation with higher doxorubicin concentrations elicited complete block of transcription and translation and cell cycle arrest before G2/M phase entry. FOXO4 is another member of the FOXO superfamily of redox-sensitive transcription factors and is involved in control of cell cycle arrest and apoptosis. FOXO4 can be transcriptionally activated by a JNK mediated phosphorylation. Doxorubicin caused accumulation of ROS and phosphorylation of JNK in Hct-116 cells. However, both were of no effect on FOXO4 and doxorubicin mediated cytotoxicity in Hct-116 cells. Instead, a connection between PI3K/AKT/FOXO4 signaling and doxorubicin mediated cytotoxicity could be found. A doxorubicin mediated activation of AKT and consequential phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO4 was detected in Hct-116 cells. Based on these findings sensitization of Hct-116 cells to doxorubicin could be achieved in this study. Overexpression of FOXO4 or dominant negative AKT rendered cells more sensitive to doxorubicin mediated cytotoxicity and apoptosis. These results indicate that inhibition of PI3K/AKT signaling or activation of redox-sensitive transcription factor FOXO4 may lead to new chances in sensitizing cancer cells to cytotoxic drugs.

6. Literaturverzeichnis

- Abaza, M. S. I., Al Saffar, A., Al Sawan, S., & Al Attiyah, R. (2008) c- myc Antisense Oligonucleotides Sensitize Human Colorectal Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs. *Tumor Biology* **29**: 287-303.
- Abdul-Ghani, R., Serra, V., Gyorffy, B., Jurchott, K., Solf, A., Dietel, M., & Schafer, R. (2005) The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1. *Oncogene* **25**: 1743-1752.
- Abe, S., Hasegawa, M., Yamamoto, K., Kurata, K., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Takizawa, T., & Kitagawa, M. (2007) Rapid induction of IAP family proteins and Smac/DIABLO expression after proapoptotic stimulation with doxorubicin in RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Experimental and Molecular Pathology* **83**: 405-412.
- Abou-El-Hassan, M. A., Rabelink, M. J., van der Vijgh, W. J., Bast, A., & Hoeben, R. C. (2003) A comparative study between catalase gene therapy and the cardioprotector monohydroxyethylrutoside in protecting against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro. *Br J Cancer* **89**: 2140-2146.
- Adams, J. M. & Cory, S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-1337.
- Aggarwal, B. B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**: 745-756.
- Ahmed-Choudhury, J., Russell, C. L., Randhawa, S., Young, L. S., Adams, D. H., & Afford, S. C. (2003) Differential induction of nuclear factor- κ B and activator protein-1 activity after CD40 ligation is associated with primary human hepatocyte apoptosis or intrahepatic endothelial cell proliferation. *Mol Biol Cell* **14**: 1334-1345.
- Akiba, S., Chiba, M., Mukaida, Y., & Sato, T. (2003) Involvement of reactive oxygen species and SP-1 in fibronectin production by oxidized LDL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310**: 491-497.
- Alexia, C., Bras, M., Fallot, G., Vadrot, N., Daniel, F., Lasfer, M., Tamouza, H., & Groyer, A. (2006) Pleiotropic effects of PI-3' kinase/Akt signaling in human hepatoma cell proliferation and drug-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1090**: 1-17.
- Anderson, M. J., Viars, C. S., Czekay, S., Cavenee, W. K., & Arden, K. C. (1998) Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* **47**: 187-199.
- Antunes, F. & Cadenas, E. (2001) Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med* **30**: 1008-1018.
- Arden, K. C. (2006) Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Experimental Gerontology* **41**: 709-717.
- Arita, Y., Harkness, S. H., Kazzaz, J. A., Koo, H., Joseph, A., Melendez, J. A., Davis, J. M., Chander, A., & Li, Y. (2006) Mitochondrial localization of catalase provides optimal protection from H₂O₂-induced cell death in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**: L978-L986.
- Ashikawa, K., Shishodia, S., Fokt, I., Priebe, W., & Aggarwal, B. B. (2004) Evidence that activation of nuclear factor- κ B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Biochemical Pharmacology* **67**: 353-364.
- Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308.
- Baeuerle, P. A. & Sies, H. (2000) Antioxidant and redox regulation of genes. *New York: Academic Press*.
- Bai, J., Rodriguez, A. M., Melendez, J. A., & Cederbaum, A. I. (1999) Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury. *J Biol Chem* **274**: 26217-26224.
- Bai, J. & Cederbaum, A. I. (2000) Overexpression of Catalase in the Mitochondrial or Cytosolic Compartment Increases Sensitivity of HepG2 Cells to Tumor Necrosis Factor-alpha-induced Apoptosis. *J Biol Chem* **275**: 19241-19249.

- Bai, J. & Cederbaum, A. I. (2001) Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept* **10**: 189-199.
- Bai, J. & Cederbaum, A. I. (2003) Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. *J Biol Chem* **278**: 4660-4667.
- Barbouti, A., Amorgianiotis, C., Kolettas, E., Kanavaros, P., & Galaris, D. (2007) Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radical Biology and Medicine* **43**: 1377-1387.
- Baud, V. & Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* **11**: 372-377.
- Beier, K., Volkl, A., & Fahimi, H. D. (1997) TNF-alpha downregulates the peroxisome proliferator activated receptor-alpha and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. *FEBS Lett* **412**: 385-387.
- Beinke, S. & Ley, Steven C. (2004) Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J* **382**: 393-409.
- Bellmann, K., Martel, J., Poirier, D. J., Labrie, M. M., & Landry, J. (2006) Downregulation of the PI3K/Akt survival pathway in cells with deregulated expression of c-Myc. *Apoptosis* **11**: 1311-1319.
- Benassi, B., Fanciulli, M., Fiorentino, F., Porrello, A., Chiorino, G., Loda, M., Zupi, G., & Biroccio, A. (2006) c-Myc Phosphorylation Is Required for Cellular Response to Oxidative Stress. *Molecular Cell* **21**: 509-519.
- Bernard, D., Quatannens, B., Begue, A., Vandebunder, B., & Abbadie, C. (2001) Antiproliferative and antiapoptotic effects of c-rel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* **61**: 2656-2664.
- Bernard, D., Monte, D., Vandebunder, B., & Abbadie, C. (2002) The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD. *Oncogene* **21**: 4392-4402.
- Bernuzzi, F., Recalcati, S., Alberghini, A., & Cairo, G. (2008) Reactive Oxygen Species-Independent Apoptosis In Doxorubicin-Treated H9c2 Cardiomyocytes: Role For Heme Oxygenase-1 Down-Modulation. *Chemico-Biological Interactions* doi:10.1016/j.cbi.2008.09.012.
- Bertazza, L. & Mocellin, S. (2008) Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Front Biosci* **13**: 2736-2743.
- Berthiaume, J. M. & Wallace, K. B. (2007) Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol* **23**: 15-25.
- Bertram, C. & Hass, R. (2008) Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem* **389**: 211-220.
- Beyaert, R., Heyninx, K., & Van Huffel, S. (2000) A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor- κ B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol* **60**: 1143-1151.
- Birkenkamp, K. U. & Coffey, P. J. (2003) Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans* **31**: 292-297.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**: 729-733.
- Blagosklonny, M. V. (2007) Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle* **6**: 70-74.
- Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J. F. M., & Carnero, A. (2007) PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* **28**: 1379-1386.

- Bonizzi, G., Piette, J., Schoonbroodt, S., Greimers, R., Havard, L., Merville, M. P., & Bours, V. (1999) Reactive Oxygen Intermediate-Dependent NF- κ B Activation by Interleukin-1 β Requires 5-Lipoxygenase or NADPH Oxidase Activity. *Mol Cell Biol* **19**: 1950-1960.
- Borenfreund, E & Puerner, J A (1986) Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed *in vitro*. *Toxicology* **39**: 121-134.
- Borkhardt, A., Repp, R., Haas, O. A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T., & Lampert, F. (1997) Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* **14**: 195-202.
- Bottero, V., Busuttill, V., Loubat, A., Magne, N., Fischel, J. L., Milano, G., & Peyron, J. F. (2001) Activation of Nuclear Factor- κ B through the IKK Complex by the Topoisomerase Poisons SN38 and Doxorubicin: A Brake to Apoptosis in HeLa Human Carcinoma Cells. *Cancer Res* **61**: 7785-7791.
- Bouchard, C., Staller, P., & Eilers, M. (1998) Control of cell proliferation by Myc. *Trends in Cell Biology* **8**: 202-206.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R. H., & Eilers, M. (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J* **23**: 2830-2840.
- Boura, E., Silhan, J., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V., & Obsil, T. (2007) Both the N-terminal loop and wing W2 of the forkhead domain of transcription factor Foxo4 are important for DNA binding. *J Biol Chem* **282**: 8265-8275.
- Brader, S. & Eccles, S. A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis. *Tumori* **90**: 2-8.
- Breen, A. P. and Murphy, J. A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* **18**: 1033-1077.
- Brown, M. R., Miller, F. J., Jr., Li, W. G., Ellingson, A. N., Mozena, J. D., Chatterjee, P., Engelhardt, J. F., Zwacka, R. M., Oberley, L. W., Fang, X., Spector, A. A., & Weintraub, N. L. (1999) Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **85**: 524-533.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E., & Yaffe, M. B. (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **156**: 817-828.
- Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., & Greenberg, M. E. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**: 2011-2015.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**: 1497-1501.
- Burgering, B. M. T. & Medema, R. H. (2003) Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* **73**: 689-701.
- Calnan, D. R. & Brunet, A. (2008) The FoxO code. *Oncogene* **27**: 2276-2288.
- Campbell, K. J., Rocha, S., & Perkins, N. D. (2004) Active Repression of Antiapoptotic Gene Expression by RelA(p65) NF- κ B. *Molecular Cell* **13**: 853-865.
- Cantley, L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-1657.
- Canty, T. G., Jr., Boyle, E. M., Jr., Farr, A., Morgan, E. N., Verrier, E. D., & Pohlman, T. H. (1999) Oxidative Stress Induces NF- κ B Nuclear Translocation Without Degradation of I κ B α . *Circulation* **100**: II-361.
- Cao, C., Leng, Y., Liu, X., Yi, Y., Li, P., & Kufe, D. (2003a) Catalase Is Regulated by Ubiquitination and Proteosomal Degradation. Role of the c-Abl and Arg Tyrosine Kinases. *Biochemistry* **42**: 10348-10353.

- Cao, C., Leng, Y., & Kufe, D. (2003b) Catalase Activity Is Regulated by c-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response. *J Biol Chem* **278**: 29667-29675.
- Carswell, E A, Old, L J, Kassel, R L, Green, S, Fiore, N, & Williamson, B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 3666-3670.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**: 2825-2837.
- Catz, S. D. & Johnson, J. L. (2001) Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor κB and its significance in prostate cancer. *Oncogene* **20**: 7342-7351.
- Chan, H., Bartos, D. P., & Owen-Schaub, L. B. (1999) Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-κB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol* **19**: 2098-2108.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-605.
- Chen, F. E. & Ghosh, G. (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF-κB transcription factors: structural views. *Oncogene* **18**: 6845-6852.
- Chen, G. & Goeddel, D. V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**: 1634-1635.
- Chen, H., Li, X., & Epstein, P. N. (2005) MnSOD and catalase transgenes demonstrate that protection of islets from oxidative stress does not alter cytokine toxicity. *Diabetes* **54**: 1437-1446.
- Chen, X., Liang, H., Van Remmen, H., Vijg, J., & Richardson, A. (2004) Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **422**: 197-210.
- Chiribau, C. B., Cheng, L., Cucoranu, I. C., Yu, Y. S., Clempus, R. E., & Sorescu, D. (2008) FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* **283**: 8211-8217.
- Choi, J. J., Choi, J., Kang, C. D., Chen, X., Wu, C. F., Ko, K. H., & Kim, W. K. (2007) Hydrogen peroxide induces the death of astrocytes through the down-regulation of the constitutive nuclear factor-κB activity. *Free Radical Research* **41**: 555-562.
- Chovolou, Y., Watjen, W., Kampkotter, A., & Kahl, R. (2003) Resistance to tumor necrosis factor-α (TNF-α)-induced apoptosis in rat hepatoma cells expressing TNF-α is linked to low antioxidant enzyme expression. *J Biol Chem* **278**: 29626-29632.
- Chovolou, Y., Watjen, W., Kampkotter, A., & Kahl, R. (2007) Downregulation of NF-κB activation in a H4IIE transfectant insensitive to doxorubicin-induced apoptosis. *Toxicology* **232**: 89-98.
- Chowdhury, K. (1991) One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **19**: 2792.
- Chuang, P. Y., Yu, Q., Fang, W., Uribarri, J., & He, J. C. (2007) Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. *Kidney Int* **72**: 965-976.
- Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., Nakajima, T., & Fukamizu, A. (2004) Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10042-10047.
- Dang, C. V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**: 1-11.
- Dasgupta, J., Subbaram, S., Connor, K. M., Rodriguez, A. M., Tirosh, O., Beckman, J. S., Jour'd'Heuil, D., & Melendez, J. A. (2006) Manganese Superoxide Dismutase Protects from TNF-α-Induced Apoptosis by Increasing the Steady-State Production of H₂O₂. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**: 1295-1305.
- Davis, R. J., D'Cruz, C. M., Lovell, M. A., Biegel, J. A., & Barr, F. G. (1994) Fusion of PAX7 to FKHR by the Variant t(1;13)(p36;q14) Translocation in Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* **54**: 2869-2872.
- de Bruin, E. C. & Medema, J. Paul (2008) Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews* doi:10.1016/j.ctrv.2008.07.001.
- Debatin, K. M. (2004) Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* **53**: 153-159.

- DeFeo-Jones, D., Garsky, V. M., Wong, B. K., Feng, D. M., Bolyar, T., Haskell, K., Kiefer, D. M., Leander, K., McAvoy, E., Lumma, P., Wai, J., Senderak, E. T., Motzel, S. L., Keenan, K., Van Zwieten, M., Lin, J. H., Freidinger, R., Huff, J., Oliff, A., & Jones, R. E. (2000) A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo. *Nat Med* **6**: 1248-1252.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**: 8543-8567.
- Delhalle, S., Deregowski, V., Benoit, V., Merville, M. P., & Bours, V. (2002) NF- κ B-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis. *Oncogene* **21**: 3917-3924.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* **17**: 2215-2223.
- Dhandapani, K. M., Mahesh, V. B., & Brann, D. W. (2007) Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NF κ B transcription factors. *J Neurochem* **102**: 522-538.
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., & Wahl, G. M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**: 2540-2551.
- Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L., & Coffey, P. J. (2000) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* **10**: 1201-1204.
- Dorn, S. B., Bolt, H. M., Thevis, M., Diel, P., & Degen, G. H. (2008) Induction of micronuclei in V79 cells by the anabolic doping steroids tetrahydrogestrinone and trenbolone. *Arch Toxicol* **82**: 257-263.
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., & Gelinas, C. (2006) Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene* **25**: 6800-6816.
- Edinger, A. L. & Thompson, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 663-669.
- Eichhorst, S. T., Muller, M., Li-Weber, M., Schulze-Bergkamen, H., Angel, P., & Krammer, P. H. (2000) A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs. *Mol Cell Biol* **20**: 7826-7837.
- Ekberg, J. & Persson, J. L. (2008) Post-translational modification of cyclin A1 is associated with staurosporine and TNF- α induced apoptosis in leukemic cells. *Mol Cell Biochem*.
- England, K. & Cotter, T. G. (2005) Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep* **10**: 237-245.
- Essers, M. A., Weijzen, S., Vries-Smiths, A. M., Saarloos, I., de Ruiter, N. D., Bos, J. L., & Burgering, B. M. (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J* **23**: 4802-4812.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* **108**: 957-962.
- Faraci, F. M. & Didion, S. P. (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1367-1373.
- Farah, I. O., Begum, R. A., & Ishaque, A. B. (2007) Differential protection and transactivation of P53, P21, Bcl2, PCNA, cyclin G, and MDM2 genes in rat liver and the HepG2 cell line upon exposure to pifithrin. *Biomed Sci Instrum* **43**: 116-121.
- Fernandez de Mattos, S., Villalonga, P., Clardy, J., & Lam, E. W. F. (2008) FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* **7**: 3237-3246.
- Finch, J. S., Tome, M. E., Kwei, K. A., & Bowden, G. T. (2006) Catalase reverses tumorigenicity in a malignant cell line by an epidermal growth factor receptor pathway. *Free Radical Biology and Medicine* **40**: 863-875.
- Fogh, J., Wright, W C, & Loveless, J D (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell Lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer institute* **58**: 209-214.

- Foo, R. S., Mani, K., & Kitsis, R. N. (2005) Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* **115**: 565-571.
- Fourquet, S., Huang, M. E., D'Autreaux, B., & Toledano, M. B. (2008) The Dual Functions of Thiol-Based Peroxidases in H₂O₂ Scavenging and Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**: 1565-1576.
- Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., & Tschlis, P. N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**: 727-736.
- Frescas, D., Valenti, L., & Accili, D. (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* **280**: 20589-20595.
- Fu, Z. & Tindall, D. J. (2008) FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* **27**: 2312-2319.
- Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Scwab, G. M., Peng, B., Uwagawa, T., Li, Z., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., & Chiao, P. J. (2004) NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* **24**: 7806-7819.
- Fukuoka, M., Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Umemura, S., & Fukamizu, A. (2003) Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med* **12**: 503-508.
- Fulda, S., Strauss, G., Meyer, E., & Debatin, K. M. (2000) Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood* **95**: 301-308.
- Furukawa-Hibi, Y., Yoshida-Araki, K., Ohta, T., Ikeda, K., & Motoyama, N. (2002) FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **277**: 26729-26732.
- Gagnon, V., Van Themsche, C., Turner, S., Leblanc, V., & Asselin, E. (2008) Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* **13**: 259-271.
- Galili, N., Davis, R. J., Fredericks, W. J., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F. J., III, Emanuel, B. S., Rovera, G., & Barr, F. G. (1993) Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* **5**: 230-235.
- Garg, A. K. & Aggarwal, B. B. (2002) Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Molecular Immunology* **39**: 509-517.
- Gewirtz, D. A. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **57**: 727-741.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.
- Giannakou, M. E. & Partridge, L. (2004) The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends in Cell Biology* **14**: 408-412.
- Gillett, C. E. & Barnes, D. M. (1998) Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* **51**: 310-316.
- Gilmore, T. D. & Temin, H. M. (1986) Different localization of the product of the v-rel oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T. *Cell* **44**: 791-800.
- Gilmore, T. D. (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**: 6680-6684.
- Girotti, A. W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* **39**: 1529-1542.
- Goetz, M. E. & Luch, A. (2008) Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett* **266**: 73-83.
- Gomes, A. R., Brosens, J. J., & Lam, E. W. (2008) Resist or die: FOXO transcription factors determine the cellular response to chemotherapy. *Cell Cycle* **7**: 3133-3136.
- Gorrini, C., Donzelli, M., Torriglia, A., Supino, R., Brison, O., Bernardi, R., Negri, C., Denegri, M., Counis, M. F., Ranzani, G. N., & Scovassi, A. I. (2003) Effect of apoptogenic stimuli on colon carcinoma cell lines with a different c-myc expression level. *Int J Mol Med* **11**: 737-742.

- Gottlieb, T. M. & Oren, M. (1996) p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* **1287**: 77-102.
- Grassilli, E., Ballabeni, A., Maellaro, E., Del Bello, B., & Helin, K. (2004) Loss of MYC confers resistance to doxorubicin-induced apoptosis by preventing the activation of multiple serine protease- and caspase-mediated pathways. *J Biol Chem* **279**: 21318-21326.
- Greer, E. L. & Brunet, A. (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**: 7410-7425.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**: 793-802.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T. F., Morris, C. A., & Sturzl, M. (2005) EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood* **105**: 3263-3269.
- Grossmann, M., O'Reilly, L. A., Gugasyan, R., Strasser, A., Adams, J. M., & Gerondakis, S. (2000) The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *EMBO J* **19**: 6351-6360.
- Gruber, B. M. & Anuszkowska, E. L. (1998) DNA repair of adriamycin induced damage in mouse and human cells differing in catalase activity. *Acta Biochim Pol* **45**: 573-577.
- Gunawardena, K., Murray, D. K., Swope, R. E., & Meikle, A. W. (2002) Inhibition of nuclear factor κ B induces apoptosis following treatment with tumor necrosis factor alpha and an antioxidant in human prostate cancer cells. *Cancer Detect Prev* **26**: 229-237.
- Haghdoust, S., Czene, S., Naslund, I., Skog, S., & Harms-Ringdahl, M. (2005) Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. *Free Radic Res* **39**: 153-162.
- Hampton, M. B. & Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* **414**: 552-556.
- Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- Hanke, N. T., Finch, J. S., & Bowden, G. T. (2008) Loss of catalase increases malignant mouse keratinocyte cell growth through activation of the stress activated JNK pathway. *Mol Carcinog* **47**: 349-360.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460.
- Hasegawa, K., Wakino, S., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hara, Y., Minakuchi, H., Washida, N., Tokuyama, H., Hayashi, K., & Itoh, H. (2008) Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **372**: 51-56.
- Hayakawa, M., Miyashita, H., Sakamoto, I., Kitagawa, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Karin, M., & Kikugawa, K. (2003) Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- κ B activation. *EMBO J* **22**: 3356-3366.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2004) Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* **18**: 2195-2224.
- Hayflick, L. & MOORHEAD, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Hehlgans, T. & Pfeffer, K. (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**: 1-20.
- Heneberg, P. & Draber, P. (2005) Regulation of cys-based protein tyrosine phosphatases via reactive oxygen and nitrogen species in mast cells and basophils. *Curr Med Chem* **12**: 1859-1871.
- Henson, P. M., Bratton, D. L., & Fadok, V. A. (2001) Apoptotic cell removal. *Curr Biol* **11**: R795-R805.
- Hermeking, H. & Benzinger, A. (2006) 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* **16**: 183-192.
- Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117**: 5965-5973.

- Hillion, J., Le Coniat, M., Jonveaux, P., Berger, R., & Bernard, O. A. (1997) AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood* **90**: 3714-3719.
- Ho, K. K., Myatt, S. S., & Lam, E. W. (2008) Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene* **27**: 2300-2311.
- Ho, W. C., Dickson, K. M., & Barker, P. A. (2005) Nuclear factor- κ B induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor- κ B-dependent transcription in cancer cells. *Cancer Res* **65**: 4273-4281.
- Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., & Ho, D. S. (2004) Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. *J Biol Chem* **279**: 32804-32812.
- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L., & Baltimore, D. (2002) The I κ B-NF- κ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science* **298**: 1241-1245.
- Hoffmann, A., Natoli, G., & Ghosh, G. (2006) Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene* **25**: 6706-6716.
- Hortobagyi, G. N. (1997) Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* **54 Suppl 4**:1-7.
- Hu, Mickey C. T. & Hung, M. C. (2005) Role of I κ B kinase in tumorigenesis. *Future Oncology* **1**: 67-78.
- Huang, H., Regan, K. M., Wang, F., Wang, D., Smith, D. I., van Deursen, J. M., & Tindall, D. J. (2005) Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1649-1654.
- Huang, H. & Tindall, D. J. (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* **120**: 2479-2487.
- Huang, Y. & Domann, F. E. (1998) Redox Modulation of AP-2 DNA Binding Activity in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **249**: 307-312.
- Hughes, G., Murphy, M. P., & Ledgerwood, E. C. (2005) Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor κ B to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem J* **389**: 83-89.
- Hui, R. C. Y., Gomes, A. R., Constantinidou, D., Costa, J. R., Karadedou, C. T., Fernandez de Mattos, S., Wymann, M. P., Brosens, J. J., Schulze, A., & Lam, E. W. F. (2008a) The Forkhead Transcription Factor FOXO3a Increases Phosphoinositide-3 Kinase/Akt Activity in Drug-Resistant Leukemic Cells through Induction of PIK3CA Expression. *Mol Cell Biol* **28**: 5886-5898.
- Hui, R. C. Y., Francis, R. E., Guest, S. K., Costa, J. R., Gomes, A. R., Myatt, S. S., Brosens, J. J., & Lam, E. W. F. (2008b) Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells. *Mol Cancer Ther* **7**: 670-678.
- Hur, G. C., Cho, S. J., Kim, C. H., Kim, M. K., Bae, S. I., Nam, S. Y., Park, J. W., Kim, W. H., & Lee, B. L. (2003) Manganese superoxide dismutase expression correlates with chemosensitivity in human gastric cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **9**: 5768-5775.
- Huxford, T., Malek, S., & Ghosh, G. (1999) Structure and mechanism in NF- κ B/I κ B signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 533-540.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**: 795-800.
- Jaattela, M. & Tschopp, J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* **4**: 416-423.
- Jackson, J. G., Kreisberg, J. I., Koterba, A. P., Yee, D., & Brattain, M. G. (2000) Phosphorylation and nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FKHR after epidermal growth factor treatment in human breast cancer cells. *Oncogene* **19**: 4574-4581.
- Janssens, S. & Tschopp, J. (2006) Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Differ* **13**: 773-784.
- Jimenez, G. S., Khan, S. H., Stommel, J. M., & Wahl, G. M. (1999) p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene* **18**: 7656-7665.
- Jin, Z. & El Deiry, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* **4**: 139-163.

- Jones, E. Y., Stuart, D. I., & Walker, N. P. C. (1989) Structure of tumour necrosis factor. *Nature* **338**: 225-228.
- Joseph, P., Muchnok, T. K., Klishis, M. L., Roberts, J. R., Antonini, J. M., Whong, W. Z., & Ong, T. (2001) Cadmium-Induced Cell Transformation and Tumorigenesis Are Associated with Transcriptional Activation of c-fos, c-jun, and c-myc Proto-Oncogenes: Role of Cellular Calcium and Reactive Oxygen Species. *Toxicol Sci* **61**: 295-303.
- Kaestner, K. H., Knochel, W., & Martinez, D. E. (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14**: 142-146.
- Kalivendi, S. V., Konorev, E. A., Cunningham, S., Vanamala, S. K., Kaji, E. H., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2005) Doxorubicin activates nuclear factor of activated T-lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium. *Biochem J* **389**: 527-539.
- Kamata, H. & Hirata, H. (1999) Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cellular Signalling* **11**: 1-14.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., & Karin, M. (2005) Reactive oxygen species promote TNF- α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**: 649-661.
- Kang, Y. J., Chen, Y., & Epstein, P. N. (1996) Suppression of Doxorubicin Cardiotoxicity by Overexpression of Catalase in the Heart of Transgenic Mice. *J Biol Chem* **271**: 12610-12616.
- Kang, Y. J., Sun, X., Chen, Y., & Zhou, Z. (2002) Inhibition of Doxorubicin Chronic Toxicity in Catalase-Overexpressing Transgenic Mouse Hearts. *Chem Res Toxicol* **15**: 1-6.
- Kasibhatla, S., Genestier, L., & Green, D. R. (1999) Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor κ B. *J Biol Chem* **274**: 987-992.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Craig, R. W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**: 6304-6311.
- Kato, T., Delhase, M., Hoffmann, A., & Karin, M. (2003) CK2 Is a C-Terminal I κ B Kinase Responsible for NF κ B Activation during the UV Response. *Molecular Cell* **12**: 829-839.
- Katoh, M. & Katoh, M. (2004) Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* **25**: 1495-1500.
- Kemler, I. & Fontana, A. (1999) Role of I κ B α and I κ B β in the biphasic nuclear translocation of NF- κ B in TNF α -stimulated astrocytes and in neuroblastoma cells. *Glia* **26**: 212-220.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
- Kikuta, K., Masamune, A., Satoh, M., Suzuki, N., Satoh, K., & Shimosegawa, T. (2006) Hydrogen peroxide activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in pancreatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* **291**: 11-20.
- Kim, D. S., Park, S. S., Nam, B. H., Kim, I. H., & Kim, S. Y. (2006) Reversal of Drug Resistance in Breast Cancer Cells by Transglutaminase 2 Inhibition and Nuclear Factor- κ B Inactivation. *Cancer Res* **66**: 10936-10943.
- Kim, H. S., Lee, T. B., & Choi, C. H. (2001) Down-Regulation of Catalase Gene Expression in the Doxorubicin-Resistant AML Subline AML-2/DX1001. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **281**: 109-114.
- Kim, J. E., Jin, D. H., Lee, S. D., Hong, S. W., Shin, J. S., Lee, S. K., Jung, D. J., Kang, J. S., & Lee, W. J. (2008) Vitamin C inhibits p53-induced replicative senescence through suppression of ROS production and p38 MAPK activity. *Int J Mol Med* **22**: 651-655.
- Kirkman, H. N. & Gaetani, G. F. (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4343-4347.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**: 5579-5588.
- Klaunig, J. E. & Kamendulis, L. M. (2004) The Role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **44**: 239-267.

- Knowles, B. B., Howe, C. C., & Aden, D. P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**: 497-499.
- Kobayashi, M., Sugiyama, H., Wang, D. H., Toda, N., Maeshima, Y., Yamasaki, Y., Masuoka, N., Yamada, M., Kira, S., & Makino, H. (2005) Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. *Kidney Int* **68**: 1018-1031.
- Koepke, J. I., Wood, C. S., Terlecky, L. J., Walton, P. A., & Terlecky, S. R. (2008) Progeric effects of catalase inactivation in human cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **232**: 99-108.
- Kops, G. J., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W., Coffey, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H., & Burgering, B. M. (2002) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**: 316-321.
- Korn, S. H., Wouters, E. F. M., Vos, N., & Janssen-Heininger, Y. M. W. (2001) Cytokine-induced Activation of Nuclear Factor- κ B Is Inhibited by Hydrogen Peroxide through Oxidative Inactivation of I κ B Kinase. *J Biol Chem* **276**: 35693-35700.
- Kortylewski, M., Feld, F., Kruger, K. D., Bahrenberg, G., Roth, R. A., Joost, H. G., Heinrich, P. C., Behrmann, I., & Barthel, A. (2003) Akt modulates STAT3-mediated gene expression through a FKHR (FOXO1a)-dependent mechanism. *J Biol Chem* **278**: 5242-5249.
- Kostrzewa-Nowak, D., Paine, M. J., Wolf, C. R., & Tarasiuk, J. (2005) The role of bioreductive activation of doxorubicin in cytotoxic activity against leukaemia HL60-sensitive cell line and its multidrug-resistant sublines. *Br J Cancer* **93**: 89-97.
- Köhler, H. B. K., Knop, J., Martin, M., de Bruin, A., Huchzermeyer, B., Lehmann, H., Kietzmann, M., Meier, B., & Nolte, I. (1999) Involvement of reactive oxygen species in TNF- α mediated activation of the transcription factor NF- κ B in canine dermal fibroblasts. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **71**: 125-142.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**: 99-163.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**: 331-342.
- La Rosa, F. A., Pierce, J. W., & Sonenshein, G. E. (1994) Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF- κ B rel family of transcription factors. *Mol Cell Biol* **14**: 1039-1044.
- Lamb, J. A., Ventura, J. J., Hess, P., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2003) JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell* **11**: 1479-1489.
- Latinis, K. M., Norian, L. A., Eliason, S. L., & Koretzky, G. A. (1997) Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* **272**: 31427-31434.
- Lau, A. T., Wang, Y., & Chiu, J. F. (2008) Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* **104**: 657-667.
- Le Bras, M., Clement, M. V., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2005) Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* **20**: 205-219.
- Lee, C. H., Jeon, Y. T., Kim, S. H., & Song, Y. S. (2007) NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy. *BioFactors* **29**: 19-35.
- Lee, K. Y., Ito, K., Hayashi, R., Jazrawi, E. P. I., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2006) NF- κ B and Activator Protein 1 Response Elements and the Role of Histone Modifications in IL-1 β -Induced TGF- β 1 Gene Transcription. *J Immunol* **176**: 603-615.
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., & Rhee, S. G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* **273**: 15366-15372.
- Lee, T. K., Lau, T. C., & Ng, I. O. (2002) Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **49**: 78-86.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., & Tjian, R. (1987) Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* **325**: 368-372.

- Lee, Y. J. & Shacter, E. (2000) Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspase-3 in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* **29**: 684-692.
- Leslie, N. R. (2006) The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxid Redox Signal* **8**: 1765-1774.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., & Korsmeyer, S. J. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**: 183-192.
- Levina, V., Su, Y., Nolen, B., Liu, X., Gordin, Y., Lee, M., Lokshin, A., & Gorelik, E. (2008) Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine network. *Int J Cancer* **123**: 2031-2040.
- Levine, B., Sinha, S., & Kroemer, G. (2008) Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* **4**: 600-606.
- Li, Q. & Verma, I. M. (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**: 725-734.
- Li, S., Zhou, Y., Wang, R., Zhang, H., Dong, Y., & Ip, C. (2007a) Selenium sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis through modulation of phospho-Akt and its downstream substrates. *Mol Cancer Ther* **6**: 1031-1038.
- Li, S., E M, & Yu, B. (2007b) Adriamycin induces myocardium apoptosis through activation of nuclear factor κ B in rat. *Mol Biol Rep*.
- Li, T. & Singal, P. K. (2000) Adriamycin-Induced Early Changes in Myocardial Antioxidant Enzymes and Their Modulation by Probucol. *Circulation* **102**: 2105-2110.
- Li, X., Lu, Y., Liang, K., Liu, B., & Fan, Z. (2005) Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **7**: R589-R597.
- Lin, X., Li, Q., Wang, Y. J., Ju, Y. W., Chi, Z. Q., Wang, M. W., & Liu, J. G. (2007) Morphine inhibits doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and nuclear factor κ B transcriptional activation in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem J* **406**: 215-221.
- Liston, P., Fong, W. G., & Korneluk, R. G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* **22**: 8568-8580.
- Liu, R., Buettner, G. R., & Oberley, L. W. (2000) Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF- α . *Free Radic Biol Med* **28**: 1197-1205.
- Luo, J. L., Kamata, H., & Karin, M. (2005) The anti-death machinery in IKK/NF- κ B signaling. *J Clin Immunol* **25**: 541-550.
- Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., & Kahl, R. (2008) Catalase overexpression impairs TNF- α induced NF- κ B activation and sensitizes MCF-7 cells against TNF- α . *J Cell Biochem* **103**: 1497-1511.
- Lüpertz, R., Chovolou, Y., Unfried, K., Kampkötter, A., Wätjen, W., & Kahl, R. (2008) The forkhead transcription factor FOXO4 sensitizes cancer cells to doxorubicin mediated cytotoxicity. *Carcinogenesis* doi:10.1093/carcin/bgn184.
- Lupi, M., Matera, G., Natoli, C., Colombo, V., & Ubezio, P. (2007) The contribution of p53 in the dynamics of cell cycle response to DNA damage interpreted by a mathematical model. *Cell Cycle* **6**: 943-950.
- Ma, S., Tang, J., Feng, J., Xu, Y., Yu, X., Deng, Q., & Lu, Y. (2008) Induction of p21 by p65 in p53 null cells treated with Doxorubicin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1783**: 935-940.
- MacEwan, D. J. (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* **14**: 477-492.
- Macian, F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**: 472-484.
- Manning, B. D. & Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274.
- Marienfeld, R., May, M. J., Berberich, I., Serfling, E., Ghosh, S., & Neumann, M. (2003) RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem* **278**: 19852-19860.

- Marklund, S. L., Westman, N. G., Lundgren, E., & Roos, G. (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* **42**: 1955-1961.
- Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., & Márquez, J. (2008) Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archives of Toxicology* **82**: 273-299.
- Matsuzaki, H., Ichino, A., Hayashi, T., Yamamoto, T., & Kikkawa, U. (2005a) Regulation of intracellular localization and transcriptional activity of FOXO4 by protein kinase B through phosphorylation at the motif sites conserved among the FOXO family. *J Biochem (Tokyo)* **138**: 485-491.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., & Fukamizu, A. (2005b) Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11278-11283.
- May, M. J. & Ghosh, S. (1997) Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* **8**: 63-73.
- May, M. J. & Ghosh, S. (1998) Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* **19**: 80-88.
- Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., & Burgering, B. M. (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**: 782-787.
- Mele, J., Van Remmen, H., Vijg, J., & Richardson, A. (2006) Characterization of transgenic mice that overexpress both copper zinc superoxide dismutase and catalase. *Antioxid Redox Signal* **8**: 628-638.
- Meyer, N., Kim, S. S., & Penn, L. Z. (2006) The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* **16**: 275-287.
- Micheau, O. & Tschopp, J. (2003) Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* **114**: 181-190.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004) Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**: 185-229.
- Mocellin, S. & Nitti, D. (2008) TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front Biosci* **13**: 2774-2783.
- Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B. M., & Milbrandt, J. (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* **277**: 47928-47937.
- Monje, P., Marinissen, M. J., & Gutkind, J. S. (2003) Phosphorylation of the Carboxyl-Terminal Transactivation Domain of c-Fos by Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediates the Transcriptional Activation of AP-1 and Cellular Transformation Induced by Platelet-Derived Growth Factor. *Mol Cell Biol* **23**: 7030-7043.
- Moore, L., Landon, E. J., & Cooney, D. A. (1977) Inhibition of the cardiac mitochondrial calcium pump by adriamycin in vitro. *Biochem Med* **18**: 131-138.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Mostert, V., Wolff, S., Dreher, I., Kohrle, J., & Abel, J. (2001) Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor-beta. *Eur J Biochem* **268**: 6176-6181.
- Movassagh, M. & Foo, R. S. (2008) Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev* **13**: 111-119.
- Muenchen, H. J., Lin, D. L., Walsh, M. A., Keller, E. T., & Pienta, K. J. (2000) Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells through Inhibition of Nuclear Factor- κ B by an I κ B α "Super-Repressor". *Clin Cancer Res* **6**: 1969-1977.
- Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K., & Kondo, T. (2003) Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem* **278**: 50226-50233.
- Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D. L., & Accili, D. (2001) The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* **108**: 1359-1367.

- Nakamura, N., Ramaswamy, S., Vazquez, F., Signoretti, S., Loda, M., & Sellers, W. R. (2000) Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol* **20**: 8969-8982.
- Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J. H., Xue, X., & Okumura, K. (2006) Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- κ B and JNK. *Cell Death Differ* **13**: 730-737.
- Nakashima, A., Kumakura, S., Mishima, S., Ishikura, H., & Kobayashi, S. (2005) IFN- α enhances TNF- α -induced apoptosis through down-regulation of c-Myc protein expression in HL-60 cells. *J Exp Clin Cancer Res* **24**: 447-456.
- Navarro, R., Martinez, R., Busnadiego, I., Ruiz-Larrea, M. B., & Ruiz-Sanz, J. I. (2006) Doxorubicin-induced MAPK activation in hepatocyte cultures is independent of oxidant damage. *Ann N Y Acad Sci* **1090**: 408-418.
- Nemoto, S. & Finkel, T. (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295**: 2450-2452.
- Neuzil, J. & Stocker, R. (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett* **331**: 281-284.
- Oberley, T. D. & Oberley, L. W. (1997) Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* **12**: 525-535.
- Obsil, T. & Obsilova, V. (2008) Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* **27**: 2263-2275.
- Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., & Obsil, T. (2005) 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* **44**: 11608-11617.
- Oshino, N., Chance, B., Sies, H., & Bucher, T. (1973) The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Arch Biochem Biophys* **154**: 117-131.
- Pagliari, L. J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D. D., Tu, S., Beere, H. M., & Green, D. R. (2005) The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17975-17980.
- Panopoulos, A., Harraz, M., Engelhardt, J. F., & Zandi, E. (2005) Iron-mediated H₂O₂ production as a mechanism for cell type-specific inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced but not interleukin-1beta-induced I κ B kinase complex/nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem* **280**: 2912-2923.
- Panta, G. R., Kaur, S., Cavin, L. G., Cortes, M. L., Mercurio, F., Lothstein, L., Sweatman, T. W., Israel, M., & Arsura, M. (2004) ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF- κ B through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* **24**: 1823-1835.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C., & Franzoso, G. (2004a) Linking JNK signaling to NF- κ B: a key to survival. *J Cell Sci* **117**: 5197-5208.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D. U., Pham, C. G., Nelsbach, A. H., Melis, T., De Smaele, E., Tang, W. J., D'Adamio, L., & Franzoso, G. (2004b) Gadd45 beta mediates the NF- κ B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* **6**: 146-153.
- Papa, S., Bubici, C., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Kuntzen, C., Knabb, J. R., Dean, K., & Franzoso, G. (2006) The NF- κ B-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* **13**: 712-729.
- Park, S. S., Kim, M. A., Eom, Y. W., & Choi, K. S. (2007) Bcl-xL blocks high dose doxorubicin-induced apoptosis but not low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **363**: 1044-1049.
- Parry, P., Wei, Y., & Evans, G. (1994) Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer* **11**: 79-84.
- Peng, D. F., Sugihara, H., & Hattori, T. (2001) Bromodeoxyuridine Induces p53-Dependent and -Independent Cell Cycle Arrests in Human Gastric Carcinoma Cell Lines. *Pathobiology* **69**: 77-85.

- Perkins, N. D. & Gilmore, T. D. (2006) Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. *Cell Death Differ* **13**: 759-772.
- Perrot, V. & Rechler, M. M. (2005) The coactivator p300 directly acetylates the forkhead transcription factor Foxo1 and stimulates Foxo1-induced transcription. *Mol Endocrinol* **19**: 2283-2298.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e36.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**: 509-515.
- Pietenpol, J. A. & Stewart, Z. A. (2002) Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* **181-182**: 475-481.
- Pillai, S., Oresajo, C., & Hayward, J. (2005) Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci* **27**: 17-34.
- Pinchuk, I., Schnitzer, E., & Lichtenberg, D. (1998) Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta* **1389**: 155-172.
- Poppek, D. & Grune, T. (2006) Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal* **8**: 173-184.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., & Sellers, W. R. (2002) A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* **2**: 81-91.
- Ranjan, P. & Boss, J. M. (2006) C/EBPbeta regulates TNF induced MnSOD expression and protection against apoptosis. *Apoptosis* **11**: 1837-1849.
- Ravizza, R., Gariboldi, M. B., Passarelli, L., & Monti, E. (2004) Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin. *BMC Cancer* **4**: 92.
- Reagan-Shaw, S. & Ahmad, N. (2007) The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **224**: 360-368.
- Reinheckel, T., Ullrich, O., Sitte, N., & Grune, T. (2000) Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* **377**: 65-68.
- Rezvani, H. R., Mazurier, F., Cario-Andre, M., Pain, C., Ged, C., Taieb, A., & de Verneuil, H. (2006) Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* **281**: 17999-18007.
- Rezvani, H. R., Ged, C., Bouadjar, B., de Verneuil, H., & Taieb, A. (2008) Catalase overexpression reduces UVB-induced apoptosis in a human xeroderma pigmentosum reconstructed epidermis. *Cancer Gene Ther* **15**: 241-251.
- Robles, S. J. & Adami, G. R. (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**: 1113-1123.
- Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**: 3179-3184.
- Röhrdanz, E., Obertriffter, B., Ohler, S., Tran-Thi, Q. H., & Kahl, R. (2000) Influence of Adriamycin and paraquat on antioxidant enzyme expression in primary rat hepatocytes. *Arch Toxicol* **74**: 231-237.
- Roninson, I. B., Broude, E. V., & Chang, B. D. (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates* **4**: 303-313.
- Rust, C. & Gores, G. J. (2000) Apoptosis and liver disease. *Am J Med* **108**: 567-574.
- Ryan, A. E., Lane, S., Shanahan, F., O'Connell, J., & Houston, A. M. (2006) Fas ligand expression in human and mouse cancer cell lines; a caveat on over-reliance on mRNA data. *J Carcinog* **5**: 5.

- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M. S., Anderson, C. W., Erickson, J. W., Appella, E., & Xie, D. (1997) Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* **36**: 10117-10124.
- Salminen, A., Ojala, J., Huuskonen, J., Kauppinen, A., Suuronen, T., & Kaarniranta, K. (2008) Interaction of aging-associated signaling cascades: inhibition of NF- κ B signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1049-1058.
- Sato, K., Ito, K., Kohara, H., Yamaguchi, Y., Adachi, K., & Endo, H. (1992) Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* **12**: 2525-2533.
- Sausville, E. A., Arbuck, S. G., Messmann, R., Headlee, D., Bauer, K. S., Lush, R. M., Murgo, A., Figg, W. D., Lahusen, T., Jaken, S., Jing, X., Roberge, M., Fuse, E., Kuwabara, T., & Senderowicz, A. M. (2001) Phase I trial of 72-hour continuous infusion UCN-01 in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol* **19**: 2319-2333.
- Scandalios, J. G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 995-1014.
- Schmidt, K. N., Amstad, P., Cerutti, P., & Baeuerle, P. A. (1995) The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chem Biol* **2**: 13-22.
- Schmidt, M., Fernandez, de Mattos, van der, Horst A., Klompmaker, R., Kops, G. J., Lam, E. W., Burgering, B. M., & Medema, R. H. (2002) Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* **22**: 7842-7852.
- Schmoll, D., Grempler, R., Barthel, A., Joost, H. G., & Walther, R. (2001) Phorbol ester-induced activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase kinase and extracellular-signal-regulated protein kinase decreases glucose-6-phosphatase gene expression. *Biochem J* **357**: 867-873.
- Schondorf, T., Becker, M., Gohring, U. J., Wappenschmidt, B., Kolhagen, H., & Kurbacher, C. M. (2001) Interaction of cisplatin, paclitaxel and adriamycin with the tumor suppressor PTEN. *Anticancer Drugs* **12**: 797-800.
- Schoonbroodt, S. & Piette, J. (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor- κ B activation pathways. *Biochem Pharmacol* **60**: 1075-1083.
- Sears, R. C. & Nevins, J. R. (2002) Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* **277**: 11617-11620.
- Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A., & Massagu, J. (2004) Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation. *Cell* **117**: 211-223.
- Sethi, G., Ahn, K. S., Pandey, M. K., & Aggarwal, B. B. (2007) Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF- κ B-regulated gene products and TAK1-mediated NF- κ B activation. *Blood* **109**: 2727-2735.
- Shaffer, J. B., Treanor, C. P., & Del Vecchio, P. J. (1990) Expression of bovine and mouse endothelial cell antioxidant enzymes following TNF- α exposure. *Free Radic Biol Med* **8**: 497-502.
- Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A., & Jongeneel, C. V. (1990) κ B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* **171**: 35-47.
- Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., Takada, Y., & Aggarwal, B. B. (2005) Redox Regulation of Apoptosis by Members of the TNF Superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**: 482-496.
- Sharma, V., Tewari, R., Sk, U. H., Joseph, C., & Sen, E. (2008) Ebselen sensitizes glioblastoma cells to Tumor Necrosis Factor (TNF α)-induced apoptosis through two distinct pathways involving NF- κ B downregulation and Fas-mediated formation of death inducing signaling complex. *Int J Cancer* **123**: 2204-2212.
- Shaulian, E. & Karin, M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**: 2390-2400.
- Shaulian, E. & Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**: E131-E136.
- Shifera, A. S., Friedman, J. M., & Horwitz, M. S. (2008) IKK gamma (NEMO) is involved in the coordination of the AP-1 and NF- κ B pathways. *Mol Cell Biochem* **310**: 181-190.

- Shinoda, C., Maruyama, M., Fujishita, T., Dohkan, J., Oda, H., Shinoda, K., Yamada, T., Miyabayashi, K., Hayashi, R., Kawagishi, Y., Fujita, T., Matsui, S., Sugiyama, E., Muraguchi, A., & Kobayashi, M. (2005) Doxorubicin induces expression of multidrug resistance-associated protein 1 in human small cell lung cancer cell lines by the c-jun N-terminal kinase pathway. *Int J Cancer* **117**: 21-31.
- Siemankowski, L. M., Morreale, J., & Briehl, M. M. (1999) Antioxidant defenses in the TNF-treated MCF-7 cells: selective increase in MnSOD. *Free Radic Biol Med* **26**: 919-924.
- Singal, P. K. & Iliskovic, N. (1998) Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* **339**: 900-905.
- Siu, Wai Yi, Yam, Cain H., & Poon, Randy Y. C. (1999) G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse Swiss3T3 cells. *FEBS Letters* **461**: 299-305.
- Sivaprasad, U. & Basu, A. (2008) Inhibition of ERK attenuates autophagy and potentiates tumour necrosis factor-alpha-induced cell death in MCF-7 cells. *J Cell Mol Med* **12**: 1265-1271.
- Sliwinska, M. A., Mosieniak, G., Wolanin, K., Babik, A., Piwocka, K., Magalska, A., Szczepanowska, J., Fronk, J., & Sikora, E. (2008) Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mechanisms of Ageing and Development* doi:10.1016/j.mad.2008.04.011.
- Smit-de Vries, M. P., van der Toorn, M., Bischoff, R., & Kauffman, H. F. (2007) Resistance of quiescent and proliferating airway epithelial cells to H₂O₂ challenge. *Eur Respir J* **29**: 633-642.
- Soule, H. D., Vazquez, A. L., Alber, S., & Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **51**: 1409-1416.
- Southern, E. M. (1979) Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem* **100**: 319-323.
- St Clair, D. K., Porntadavity, S., Xu, Y., & Kiningham, K. (2002) Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol* **349**: 306-312.
- Stan, S. D., Hahm, E. R., Warin, R., & Singh, S. V. (2008) Withaferin A Causes FOXO3a- and Bim-Dependent Apoptosis and Inhibits Growth of Human Breast Cancer Cells In vivo. *Cancer Res* **68**: 7661-7669.
- Stewart, Z. A. & Pietsenpol, J. A. (2001) p53 Signaling and Cell Cycle Checkpoints. *Chem Res Toxicol* **14**: 243-263.
- Stone, J. R. & Yang, S. (2006) Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**: 243-270.
- Su, X., Cheng, J., Liu, W., Liu, C., Wang, Z., Yang, P., Zhou, T., & Mountz, J. D. (1998) Autocrine and paracrine apoptosis are mediated by differential regulation of Fas ligand activity in two distinct Jurkat T cell populations. *J Immunol* **160**: 5288-5293.
- Sugimoto, K., Tamayose, K., Sasaki, M., Hayashi, K., & Oshimi, K. (2002) Low-dose doxorubicin-induced necrosis in Jurkat cells and its acceleration and conversion to apoptosis by antioxidants. *Br J Haematol* **118**: 229-238.
- Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N., & Gotoh, Y. (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol* **170**: 295-304.
- Sunters, A., Madureira, P. A., Pomeranz, K. M., Aubert, M., Brosens, J. J., Cook, S. J., Burgering, B. M., Coombes, R. C., & Lam, E. W. (2006) Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Res* **66**: 212-220.
- Suzuki, Y. J., Mizuno, M., & Packer, L. (1995) Transient overexpression of catalase does not inhibit TNF- or PMA-induced NF- κ B activation. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 537-541.
- Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G. C., Mahabeleshwar, G. H., Singh, S., & Aggarwal, B. B. (2003) Hydrogen Peroxide Activates NF- κ B through Tyrosine Phosphorylation of I κ B α and Serine Phosphorylation of p65: Evidence for the involvement of I κ B α kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **278**: 24233-24241.
- Tan, W. Q., Wang, K., Lv, D. Y., & Li, P. F. (2008) Foxo3a inhibits cardiomyocyte hypertrophy through transactivating catalase. *J Biol Chem* M805514200.

- Tang, T. T., Dowbenko, D., Jackson, A., Toney, L., Lewin, D. A., Dent, A. L., & Lasky, L. A. (2002) The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem* **277**: 14255-14265.
- Tari, A. M., Mehta, A., & Lopez-Berestein, G. (2001) Modulation of Akt activity by doxorubicin in breast cancer cells. *J Chemother* **13**: 334-336.
- Tergaonkar, V., Bottero, V., Ikawa, M., Li, Q., & Verma, I. M. (2003) I κ B Kinase-Independent I κ B α Degradation Pathway: Functional NF- κ B Activity and Implications for Cancer Therapy. *Mol Cell Biol* **23**: 8070-8083.
- Testa, J. R. & Bellacosa, A. (2001) AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10983-10985.
- Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J., & Ploegh, H. L. (2000) Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol* **18**: 861-926.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R. D., & Huang, P. (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1343-1374.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., Jr., DiStefano, P. S., Chiang, L. W., & Greenberg, M. E. (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296**: 530-534.
- True, A. L., Rahman, A., & Malik, A. B. (2000) Activation of NF- κ B induced by H₂O₂ and TNF- α and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L302-L311.
- Tsai, K. L., Sun, Y. J., Huang, C. Y., Yang, J. Y., Hung, M. C., & Hsiao, C. D. (2007) Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res* **35**: 6984-6994.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., & Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* **23**: 1889-1899.
- Turpaev, K. T. (2002) Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)* **67**: 281-292.
- Ubezio, P. & Civoli, F. (1994) Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic Biol Med* **16**: 509-516.
- Urbich, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Walter, D. H., Bruhl, T., Potente, M., Hofmann, W. K., de Vos, S., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2005) FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J* 04-2727je.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**: 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**: 44-84.
- Van Cruchten, S. & Van Den, Broeck W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* **31**: 214-223.
- van der Heide, L. P., Jacobs, F. M., Burbach, J. P., Hoekman, M. F., & Smidt, M. P. (2005) FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling. *Biochem J* **391**: 623-629.
- van der Horst, A., Tertoolen, L. G., Vries-Smits, L. M., Frye, R. A., Medema, R. H., & Burgering, B. M. (2004) FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* **279**: 28873-28879.
- van der Horst, A., Vries-Smits, A. M., Brenkman, A. B., van Triest, M. H., van den, Broek N., Colland, F., Maurice, M. M., & Burgering, B. M. (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* **8**: 1064-1073.
- van der Horst, A. & Burgering, B. M. (2007) Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 440-450.

- van der Vos, K. E. & Coffey, P. J. (2008) FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene* **27**: 2289-2299.
- van Rooij, E., Doevendans, P. A., de Theije, C. C., Babiker, F. A., Molkenin, J. D., & de Windt, L. J. (2002) Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* **277**: 48617-48626.
- Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D. R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **346 Pt 3**: 561-576.
- Venkatakrishnan, C. D., Dunsmore, Kathy, Wong, Hector, Roy, Sashwathi, Sen, Chandan K., Wani, Altaf, Zweier, Jay L., & Ilangoan, Govindasamy (2008) HSP27 regulates p53 transcriptional activity in doxorubicin-treated fibroblasts and cardiac H9c2 cells: p21 upregulation and G2/M phase cell cycle arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**: H1736-H1744.
- Vivanco, I. & Sawyers, C. L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 489-501.
- Vousden, K. H. & Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**: 594-604.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., & Stillman, B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**: 574-578.
- Wagner, B. A., Evig, C. B., Reszka, K. J., Buettner, G. R., & Burns, C. P. (2005) Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. *Arch Biochem Biophys* **440**: 181-190.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003) TNF signaling. *Cell Death Differ* **10**: 45-65.
- Walter, P. L., Steinbrenner, H., Barthel, A., & Klotz, L. O. (2008) Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 316-321.
- Wan, X., Li, J., Xie, X., & Lu, W. (2007) PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *Int J Gynecol Cancer* **17**: 808-812.
- Wang, G. W., Klein, J. B., & Kang, Y. J. (2001) Metallothionein Inhibits Doxorubicin-Induced Mitochondrial Cytochrome c Release and Caspase-3 Activation in Cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 461-468.
- Wang, L., Ma, W., Markovich, R., Lee, W. L., & Wang, P. H. (1998) Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* **139**: 1354-1360.
- Wang, S., Kotamraju, S., Konorev, E., Kalivendi, S., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2002) Activation of nuclear factor- κ B during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J* **367**: 729-740.
- Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004) Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms: Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem* **279**: 25535-25543.
- Ware, C. F. (2008) The TNF Superfamily-2008. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**: 183-186.
- Weidinger, C., Krause, K., Klagge, A., Karger, S., & Fuhrer, D. (2008) FOXOs: critical conductors of cancer's fate. *Endocr Relat Cancer*.
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V., & Dixit, V. M. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature* **430**: 694-699.
- Wilkins, B. J., Dai, Y. S., Bueno, O. F., Parsons, S. A., Xu, J., Plank, D. M., Jones, F., Kimball, T. R., & Molkenin, J. D. (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* **94**: 110-118.
- Willis, S. N. & Adams, J. M. (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 617-625.
- Wong, G. H. & Goeddel, D. V. (1988) Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**: 941-944.

- Wong, G. H., Elwell, J. H., Oberley, L. W., & Goeddel, D. V. (1989) Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* **58**: 923-931.
- Wright, C. W. & Duckett, C. S. (2005) Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *J Clin Invest* **115**: 2673-2678.
- Wright, W. E. & Shay, J. W. (2001) Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 98-103.
- Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S., & Miyamoto, S. (2006) Molecular linkage between the kinase ATM and NF- κ B signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* **311**: 1141-1146.
- Xia, S. J. & Barr, F. G. (2005) Chromosome translocations in sarcomas and the emergence of oncogenic transcription factors. *Eur J Cancer* **41**: 2513-2527.
- Xiao, G., Harhaj, E. W., & Sun, S. C. (2001) NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol Cell* **7**: 401-409.
- Xu, Y., Porntadavity, S., & St Clair, D. K. (2002) Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* **362**: 401-412.
- Yamamura, Y., Lee, W. L., Inoue, K., Ida, H., & Ito, Y. (2006) RUNX3 Cooperates with FoxO3a to Induce Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *J Biol Chem* **281**: 5267-5276.
- Yamaoka, T., Yan, F., Cao, H., Hobbs, S. S., Dise, R. S., Tong, W., & Polk, D. B. (2008) Transactivation of EGF receptor and ErbB2 protects intestinal epithelial cells from TNF-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 11772-11777.
- Yang, H., Zhao, R., Yang, H. Y., & Lee, M. H. (2005) Constitutively active FOXO4 inhibits Akt activity, regulates p27 Kip1 stability, and suppresses HER2-mediated tumorigenicity. *Oncogene* **24**: 1924-1935.
- Yasmin, W. G., Parkin, J. L., Caspers, J. I., & Theologides, A. (1991) Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Res* **51**: 3990-3995.
- Yeagley, D., Guo, S., Unterman, T., & Quinn, P. G. (2001) Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription. Roles of forkhead and insulin response sequences. *J Biol Chem* **276**: 33705-33710.
- Yeh, C. C., Wan, X. S., & St Clair, D. K. (1998) Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* **17**: 921-930.
- Yin, K. J., Lee, J. M., Chen, S. D., Xu, J., & Hsu, C. Y. (2002) Amyloid-beta induces Smac release via AP-1/Bim activation in cerebral endothelial cells. *J Neurosci* **22**: 9764-9770.
- Yin, Li, Huang, Lei, & Kufe, Donald (2004) MUC1 Oncoprotein Activates the FOXO3a Transcription Factor in a Survival Response to Oxidative Stress. *J Biol Chem* **279**: 45721-45727.
- Yin, X., Wu, H., Chen, Y., & Kang, Y. J. (1998) Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem Pharmacol* **56**: 87-93.
- Yu, C. X., Li, S., & Whorton, A. R. (2005) Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols. *Mol Pharmacol* **68**: 847-854.
- Yu, H. G., Ai, Y. W., Yu, L. L., Zhou, X. D., Liu, J., Li, J. H., Xu, X. M., Liu, S., Chen, J., Liu, F., Qi, Y. L., Deng, Q., Cao, J., Liu, S. Q., Luo, H. S., & Yu, J. P. (2008) Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. *Int J Cancer* **122**: 433-443.
- Yuan, T. L. & Cantley, L. C. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**: 5497-5510.
- Zanetti, M., Katusic, Z. S., & O'Brien, T. (2002) Adenoviral-mediated overexpression of catalase inhibits endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H2620-H2626.
- Zhao, Y., You, H., Yang, Y., Wei, L., Zhang, X., Yao, L., Fan, D., & Yu, Q. (2004) Distinctive regulation and function of PI 3K/Akt and MAPKs in doxorubicin-induced apoptosis of human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* **91**: 621-632.

Zheng, L., Bidere, N., Staudt, D., Cubre, A., Orenstein, J., Chan, F. K., & Lenardo, M. (2006) Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol* **26**: 3505-3513.

Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics* **92**: 57-70.

Zmijewski, J. W., Zhao, X., Xu, Z., & Abraham, E. (2007) Exposure to hydrogen peroxide diminishes NF- κ B activation, I κ B- α degradation, and proteasome activity in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**: C255-C266.

7. Anhang

Tabellen der Originaldaten

Tabelle1: Katalase Aktivitätsmessung (MCF-7) (Units pro mg Protein.)

	Versuch I	Versuch II	Versuch III
MCF-7wt	9	6	8
MCF-7kat	95	105	99
MCF-7mkat	58	61	58

Tabelle2: H₂O₂ Viabilität (ohne FCS)

Versuch I	H ₂ O ₂ [µM]						
	0	10	25	50	75	100	250
MCF-7wt OD	0,42	0,38	0,37	0,33	0,27	0,21	0,07
MCF-7wt [%]	100,00	92,41	90,06	80,54	65,66	51,33	16,95
MCF-7kat OD	0,46	0,45	0,46	0,40	0,40	0,35	0,22
MCF-7kat [%]	100,00	98,10	100,05	86,89	86,29	74,81	47,87
Versuch II	0	10	25	50	75	100	250
MCF-7wt OD	0,42	0,41	0,39	0,34	0,29	0,24	0,06
MCF-7wt [%]	100,00	99,28	94,01	81,25	69,02	58,56	13,52
MCF-7kat OD	0,48	0,47	0,48	0,44	0,43	0,39	0,20
MCF-7kat [%]	100,00	98,95	100,84	93,24	89,46	82,54	42,98
Versuch III	0	10	25	50	75	100	250
MCF-7wt OD	0,30	0,28	0,26	0,21	0,13	0,10	0,05
MCF-7wt [%]	100,00	93,78	87,23	70,67	43,61	32,69	17,03
MCF-7kat OD	0,37	0,38	0,35	0,33	0,28	0,28	0,11
MCF-7kat [%]	100,00	102,88	95,04	88,68	74,48	74,68	28,56
Versuch IV	0	10	25	50	75	100	250
MCF-7wt OD	0,28	0,25	0,23	0,19	0,14	0,10	0,04
MCF-7wt [%]	100,00	91,31	82,89	69,62	51,25	35,36	17,27
MCF-7kat OD	0,37	0,35	0,35	0,33	0,29	0,27	0,16
MCF-7kat [%]	100,00	94,52	95,20	89,17	78,21	72,19	47,10

Tabelle3: H₂O₂ Viabilität (mit FCS)

Versuch I	H ₂ O ₂ [µM]							
	0	50	100	150	250	350	450	550
MCF-7wt OD	0,22	0,21	0,17	0,16	0,13	0,13	0,10	0,11
MCF-7wt [%]	100,00	95,85	77,54	75,85	60,92	61,54	48,00	50,00
MCF-7kat OD	0,13	0,13	0,11	0,12	0,10	0,10	0,10	0,09
MCF-7kat [%]	100,00	98,98	84,73	93,89	78,88	79,39	76,84	68,19
MCF-7mkat OD	0,15	0,14	0,13	0,13	0,13	0,12	0,13	0,10
MCF-7mkat [%]	100,00	94,77	89,07	92,16	93,59	90,26	85,75	79,57
Versuch II	0	10	25	50	75	100	250	251
MCF-7wt OD	0,22	0,22	0,17	0,17	0,15	0,14	0,12	0,12
MCF-7wt [%]	100,00	101,05	75,71	77,81	67,47	62,29	51,72	53,52
MCF-7kat OD	0,15	0,15	0,13	0,14	0,13	0,13	0,11	0,10
MCF-7kat [%]	100,00	100,44	84,68	89,50	82,71	86,43	73,30	65,65
MCF-7mkat OD	0,16	0,16	0,16	0,15	0,16	0,15	0,15	0,13
MCF-7mkat [%]	100,00	102,32	100,42	94,95	98,74	93,68	95,79	85,05
Versuch III	0	10	25	50	75	100	250	251
MCF-7wt OD	0,49	0,41	0,40	0,38	0,36	0,33	0,30	0,27
MCF-7wt [%]	100,00	84,46	82,21	77,03	73,55	67,48	61,83	54,94
MCF-7kat OD	0,47	0,42	0,41	0,40	0,37	0,35	0,31	0,25
MCF-7kat [%]	100,00	89,82	86,70	84,51	78,85	74,54	65,28	53,96
MCF-7mkat OD	0,45	0,41	0,39	0,38	0,38	0,36	0,36	0,29
MCF-7mkat [%]	100,00	90,62	87,08	83,83	84,27	78,95	78,66	64,03
Versuch IV	0	10	25	50	75	100	250	251
MCF-7wt OD	0,46	0,43	0,36	0,35	0,32	0,32	0,28	0,26
MCF-7wt [%]	100,00	94,29	78,96	76,21	68,76	69,85	60,52	56,83
MCF-7kat OD	0,38	0,36	0,35	0,33	0,32	0,27	0,24	0,24
MCF-7kat [%]	100,00	94,62	91,49	86,46	83,94	70,40	61,20	62,07
MCF-7mkat OD	0,37	0,35	0,31	0,34	0,28	0,32	0,28	0,26
MCF-7mkat [%]	100,00	94,81	85,26	91,63	76,71	88,08	76,25	70,25

Tabelle4: DCF-Messung nach H₂O₂ Bolus Gabe (Werte sind angegeben in RFU)

MCF-7wt	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
0	6418	6537	5234	7326	8605	11762	5979	6074	3435	4078
5	7364	8152	6346	6847	20728	13750	7419	7930	3853	4705
10	14108	14698	10336	18278	30357	29106	12775	13214	7206	10028
15	18713	18681	13130	24551	37261	40133	16604	16721	9928	13632
20	20760	21040	15017	27935	41408	45968	18450	19043	11579	15811
25	22868	22907	16582	30949	44448	49889	20464	20415	12605	17332
30	23608	23816	17738	32769	46267	53045	21367	21405	13594	18505
35	24648	24855	18506	34183	47530	54730	22578	22585	14435	19260
40	25773	25600	19237	34919	48795	55941	23165	23325	15034	19511
45	25714	25788	20032	35759	49069	56935	23796	23733	14833	20440
50	26216	26353	20197	36384	50082	57965	23769	23650	15631	20495
55	26452	26605	20968	36511	50279	59067	24611	24478	15986	20868
60	26835	26973	20842	37149	50508	59148	24918	24646	16058	21147
65	27428	27159	21972	37486	51483	59272	25022	24827	16381	21877
70	27385	27342	21626	38078	51693	60242	25101	25040	16253	21707
75	27608	27761	22074	38287	52253	60565	25554	25353	16397	22319
80	28131	28190	22376	37900	52628	61378	25266	25578	16565	22309
85	28493	27863	21938	38051	53309	61742	26270	26092	16704	22227
90	28593	28188	22145	38454	53237	61604	26254	26088	16741	22322
95	28939	28321	23076	38498	54226	62546	26636	25714	16879	22192
100	29316	28471	22905	38880	54871	63600	26235	26253	16937	22521
MCF-7kat	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
0	6475	6970	10312	9909	5316	5646	5601	5679	5896	5771
5	7443	7848	11810	11708	6359	6658	6718	6669	6762	6174
10	13581	13296	23109	21682	11783	11540	11929	11049	11325	10710
15	16301	15915	28794	27440	14338	14017	14202	13293	14481	10410
20	18533	18005	31808	30820	15960	15714	16008	14975	16331	15632
25	20064	19629	33066	32279	17431	17209	17423	16051	18095	16775
30	20739	20338	33988	33867	17872	17687	18041	16366	19191	17641
35	21052	20628	34473	34453	18536	18105	18663	17007	19749	18687
40	22126	21235	35167	35482	18735	18433	18863	17353	20652	19440
45	22243	21083	35935	35867	19163	18208	19099	17759	21258	19356
50	22128	21450	36394	36731	19569	18844	19126	17910	21805	19685
55	22302	21358	36377	37068	19590	19234	19399	18221	22025	20146
60	22323	21934	36879	37100	19857	19636	19918	18603	22328	20645
65	22920	21805	37004	37657	20174	19591	20512	18758	22844	20569
70	22355	22003	37340	37673	20488	19186	20492	18636	23250	20647
75	23114	22562	37818	38106	20633	19503	20587	18716	23214	20941
80	23423	22244	37885	38605	20846	19841	20624	18941	23141	20876
85	23586	22825	38420	38679	20661	20262	21148	19093	23118	20867
90	23844	23133	38649	38998	21435	20170	21247	19562	23321	21144
95	23658	23228	38813	39408	21297	20691	21168	19979	22933	21345
100	24069	23108	39373	39816	22023	21006	20975	20282	22884	21200
MCF-7mkat	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
0	6383	5824	5576	5558	5463	5944	5741	5885	7222	6186
5	7349	6574	6369	6228	5951	7331	7204	7200	7663	6516
10	11554	10323	9107	8965	8401	12125	12181	11742	11387	9850
15	14243	12922	10710	10273	9589	15511	15078	14461	13906	12234
20	15833	14388	11917	11220	10660	17264	16724	15692	15653	13919
25	17350	15530	12525	12014	11364	18235	18164	17092	16755	14598
30	18387	16914	12971	12394	11888	19028	18832	17915	18017	15693
35	19527	17598	13264	12525	12040	19485	19295	17967	18840	16620
40	20365	18202	13561	12733	12331	20149	19842	18680	19314	17158
45	20921	19018	13780	13155	12666	20501	19783	18490	19647	17441
50	21099	18999	13617	12928	12543	20490	20182	18978	20053	18003
55	21393	19281	13811	13339	12770	20609	20365	19027	20734	18136
60	21922	20027	14049	13811	13068	20567	20257	19148	20565	18243
65	22013	20035	14320	13704	13223	20991	20459	18957	20840	18224
70	22377	20547	14456	13618	13049	21298	20698	19450	20882	18562
75	22676	20617	14551	13834	13046	21262	20803	19240	21018	18357
80	22626	20376	14929	14200	13330	21587	20627	19245	20686	18636
85	22951	20706	14724	14076	13328	21647	21035	19734	20561	18694
90	23286	21026	14940	14234	13663	21453	21227	19660	22407	18795
95	23415	21327	14654	14178	13786	21473	21058	19888	20253	18581
100	24065	21624	14611	14235	13715	21350	21635	19784	20504	18798

Tabelle5: TNF- α Viabilität

Versuch I	TNF- α [ng/ml]					
	0	1	5	10	25	50
MCF-7wt OD	0,976	0,942	0,670	0,519	0,412	0,359
MCF-7wt [%]	100,00	96,47	68,66	53,14	42,18	36,75
MCF-7kat OD	0,62	0,54	0,27	0,20	0,16	0,15
MCF-7kat [%]	100,00	87,07	44,15	32,24	26,59	23,82
MCF-7mkat OD	0,67	0,52	0,28	0,20	0,19	0,16
MCF-7mkat [%]	100,00	77,69	42,47	29,70	28,13	23,43
Versuch II	0	10	25	50	75	100
MCF-7wt OD	0,78	0,70	0,49	0,40	0,37	0,31
MCF-7wt [%]	100,00	88,97	62,28	51,34	46,88	40,08
MCF-7kat OD	0,64	0,51	0,34	0,26	0,23	0,20
MCF-7kat [%]	100,00	79,01	53,39	41,08	35,09	31,04
MCF-7mkat OD	0,51	0,39	0,24	0,20	0,17	0,14
MCF-7mkat [%]	100,00	75,86	46,87	38,85	33,07	27,49
Versuch III	0	10	25	50	75	100
MCF-7wt OD	0,80	0,74	0,56	0,47	0,38	0,33
MCF-7wt [%]	100,00	92,32	70,22	58,82	47,92	41,74
MCF-7kat OD	0,63	0,56	0,42	0,32	0,26	0,18
MCF-7kat [%]	100,00	88,56	66,48	50,97	40,52	28,73
MCF-7mkat OD	0,50	0,37	0,31	0,22	0,17	0,14
MCF-7mkat [%]	100,00	73,83	60,87	43,52	33,65	28,02
Versuch IV	0	10	25	50	75	100
MCF-7wt OD	0,78	0,71	0,53	0,42	0,35	0,31
MCF-7wt [%]	100,00	91,36	67,68	54,08	45,06	39,71
MCF-7kat OD	0,50	0,42	0,28	0,21	0,19	0,14
MCF-7kat [%]	100,00	83,85	57,04	41,54	37,71	28,67
MCF-7mkat OD	0,46	0,39	0,27	0,20	0,17	0,14
MCF-7mkat [%]	100,00	84,12	59,99	44,43	36,74	30,51
Versuch V	0	10	25	50	75	100
MCF-7wt OD	0,84	0,75	0,56	0,46	0,38	0,36
MCF-7wt [%]	100,00	89,09	66,08	54,22	45,54	42,39
MCF-7kat OD	0,73	0,63	0,42	0,33	0,29	0,24
MCF-7kat [%]	100,00	86,35	57,03	44,89	39,95	33,16
MCF-7mkat OD	0,671	0,548	0,371	0,307	0,250	0,204
MCF-7mkat [%]	100,00	81,73	55,26	45,71	37,32	30,43

Tabelle6: Caspase-3 Aktivierung nach TNF- α Inkubation

MCF-7wt	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
Versuch I	1,31	2,70	3,60	3,75
Versuch II	1,46	3,08	3,94	4,28
Versuch III	2,30	3,05	5,15	4,30
Versuch IV	0,83	1,88	2,25	1,80
MCF-7kat				
Versuch I	0,79	3,71	6,00	6,04
Versuch II	1,00	3,45	5,55	7,15
Versuch III	1,00	5,60	5,90	7,70
Versuch IV	1,58	5,48	7,39	7,31
MCF-7mkat				
Versuch I	0,98	4,58	6,00	5,78
Versuch II	0,90	4,43	5,48	5,63
Versuch III	1,73	5,10	8,55	6,83

Tabelle7: Caspase-8/-10 Aktivierung nach TNF- α Inkubation

MCF-7wt	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
Versuch I	3,65	5,35	7,40	7,65
Versuch II	3,75	2,80	5,15	4,35
Versuch III	2,05	4,20	4,95	4,75
Versuch IV	1,90	4,40	4,75	4,50
MCF-7kat				
Versuch I	2,10	7,20	10,45	9,55
Versuch II	2,80	5,95	8,15	5,45
Versuch III	2,20	4,85	6,45	9,45
Versuch IV	2,05	4,75	6,65	5,55

Tabelle8: Caspase-9 Aktivierung nach TNF- α Inkubation

MCF-7wt	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
Versuch I	5,70	8,25	8,90	9,05
Versuch II	3,30	5,60	5,70	5,80
Versuch III	3,85	5,85	6,30	6,10
Versuch IV	3,90	5,00	5,40	5,70
MCF-7kat	TNF- α [ng/ml]			
Versuch I	5,35	8,55	11,30	12,60
Versuch II	3,75	8,55	10,90	10,90
Versuch III	3,45	9,25	11,35	11,10
Versuch IV	2,85	6,40	8,80	8,50

Tabelle9: Katalase Expression nach TNF- α Inkubation (RT-PCR)

(Quotient der densitometrischen Werte aus Katalase-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
Kat/GAPDH	1,39	0,96	0,67	0,56
Werte [x-fach]	1,00	0,69	0,48	0,40
Versuch II	TNF- α [ng/ml]			
Kat/GAPDH	1,45	1,16	1,10	0,73
Werte [x-fach]	1,00	0,80	0,76	0,50
Versuch III	TNF- α [ng/ml]			
Kat/GAPDH	1,61	1,06	0,95	0,20
Werte [x-fach]	1,00	0,66	0,59	0,12

Tabelle10: Katalase Expression nach TNF- α Inkubation (Realtime-PCR)

(Ergebnisse nach Auswertung mit dem REST Programm.)

Versuch I	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
Katalase	1,00	0,55	0,38	0,67
Versuch II	TNF- α [ng/ml]			
Katalase	1,00	0,60	0,58	0,33
Versuch III	TNF- α [ng/ml]			
Katalase	1,00	0,49	0,49	0,45

Tabelle11: Katalase Aktivität nach TNF- α Inkubation (Aktivität in Units pro mg Protein.)

Versuch I	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
Versuch I	10	10	9	7
Versuch II	9	9	6	6
Versuch III	9	10	7	6
Versuch IV	7	8	7	7
Versuch V	9	8	7	7

Tabelle12: Katalase Expression nach TNF- α Inkubation (Western Blot)

(Katalase-Intensität nach densitometrischer Auswertung.)

Versuch I	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
Katalase	1777,6	1635,65	1380,92	1378,59
Versuch II	TNF- α [ng/ml]			
Katalase	1483,27	1436,15	1043,62	1038,86
Versuch III	TNF- α [ng/ml]			
Katalase	2051,07	1766,02	1029,94	951,99

Tabelle13: NF- κ B Translokation nach 50 ng/ml TNF- α Inkubation (Western Blot)(NF- κ B-Intensität nach densitometrischer Auswertung.)

TNF- α	MCF-7wt		MCF-7kat	
	Densitometrie	p65 [x-fach]	Densitometrie	p65 [x-fach]
0	7,57	1,00	14,52	1,00
1,5	393,15	51,94	524,57	36,13
3	343,82	45,42	336,36	23,17
6	399,73	52,80	219,56	15,12
9	434,88	57,45	146,15	10,07

Tabelle14: NF- κ B Translokation nach 50 ng/ml + 1 mM H₂O₂ Inkubation (Western Blot)
(NF- κ B-Intensität nach densitometrischer Auswertung.)

TNF- α	H ₂ O ₂	MCF-7wt		MCF-7kat	
Zeit [h]	Zeit [h]	Densitometrie	p65 [x-fach]	Densitometrie	p65 [x-fach]
0	-	7,71	1,00	7,61	1,00
1,5	-	324,53	42,09	185,37	24,36
2	-	330,07	42,81	205,64	27,02
3	-	276,46	35,86	117,69	15,47
6	-	329,29	42,71	70,54	9,27
2	0,5	629,71	81,67	327,57	43,04
3	1,5	513,66	66,62	267,05	35,09
6	4,5	288,06	37,36	239,9	31,52

Tabelle15: NF- κ B-SEAP Reporter Assay nach TNF- α Inkubation (Messwerte/ml.)

MCF-7wt	Zeit [h]							
Versuch	0	1,5	3	4,5	6	7,5	9	10,5
I	319,5	1557,0	4092,1	7145,0	14602,9	18218,8	31959,3	29918,6
II	347,0	1372,5	2919,5	7226,1	11107,6	16963,1	21390,7	31990,7
III	159,5	376,3	1275,0	-	4968,2	7312,5	10348,7	13735,0
IV	257,0	515,8	1985,0	-	7614,1	12599,4	16654,7	18795,7
V	252,5	844,2	2096,1	5177,1	7770,0	11697,3	14756,4	19640,8
MCF-7kat	0	1,5	3	4,5	6	7,5	9	10,5
I	412,0	922,0	2350,0	4290,6	8754,1	13165,6	15482,0	19966,4
II	192,0	343,0	837,9	-	2771,8	4206,9	5634,0	6836,4
III	221,0	398,0	1162,6	-	4316,5	6361,3	8897,3	10933,6
IV	228,0	551,5	1176,8	3004,7	4972,5	7249,3	9696,4	12855,4

Tabelle16: MnSOD Expression nach TNF- α Inkubation (RT-PCR)
(Quotient der densitometrischen Werte aus MnSOD-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	TNF- α [ng/ml]			
	0	10	25	50
MCF-7wt Mn/GAP	0,13	0,45	0,67	0,87
MCF-7wt [x-fach]	1,00	3,59	5,34	6,97
MCF-7kat Mn/GAP	0,10	0,51	0,58	0,74
MCF-7kat [x-fach]	1,00	5,23	5,91	7,62
Versuch II				
MCF-7wt Mn/GAP	0,11	0,51	0,61	0,81
MCF-7wt [x-fach]	1,00	4,57	5,53	7,25
MCF-7kat Mn/GAP	0,12	0,62	0,77	0,94
MCF-7kat [x-fach]	1,00	5,37	6,68	8,12
Versuch III				
MCF-7wt Mn/GAP	0,09	0,37	0,46	0,60
MCF-7wt [x-fach]	1,00	4,09	5,01	6,53
MCF-7kat Mn/GAP	0,11	0,49	0,59	0,68
MCF-7kat [x-fach]	1,00	4,35	5,22	6,02

Tabelle17: Katalase Expression nach 50 ng/ml TNF- α Inkubation (RT-PCR)
(Quotient der densitometrischen Werte aus Katalase-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	Zeit [h]				
	0	1,5	3	6	9
Kat/GAPDH	0,84	0,83	0,85	0,68	0,53
Werte [x-fach]	1,00	0,99	1,01	0,81	0,63
Versuch II					
Kat/GAPDH	0,94	0,88	0,90	0,77	0,61
Werte [x-fach]	1,00	0,93	0,96	0,82	0,65
Versuch III					
Kat/GAPDH	0,95	0,92	1,01	0,84	0,58
Werte [x-fach]	1,00	0,97	1,06	0,88	0,61
Versuch IV					
Kat/GAPDH	0,65	0,46	0,47	0,43	0,45
Werte [x-fach]	1,00	0,70	0,72	0,66	0,68
Versuch V					
Kat/GAPDH	0,73	0,53	0,52	0,37	0,32
Werte [x-fach]	1,00	0,71	0,71	0,50	0,44

Tabelle18: MnSOD Expression nach 50 ng/ml TNF- α Inkubation (RT-PCR)
(Quotient der densitometrischen Werte aus MnSOD-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	TNF- α [ng/ml]				
	0	1,5	3	6	9
MCF-7wt Mn/GAP	0,28	0,52	0,84	0,83	0,99
MCF-7wt [x-fach]	1,00	1,88	3,02	3,01	3,56
MCF-7kat Mn/GAP	0,35	0,70	0,95	1,29	1,42
MCF-7kat [x-fach]	1,00	2,04	2,74	3,75	4,11
Versuch II					
MCF-7wt Mn/GAP	0,08	0,14	0,20	0,22	0,27
MCF-7wt [x-fach]	1,00	1,70	2,37	2,69	3,20
MCF-7kat Mn/GAP	0,08	0,16	0,23	0,27	0,35
MCF-7kat [x-fach]	1,00	1,93	2,77	3,14	4,09
Versuch III					
MCF-7wt Mn/GAP	0,12	0,17	0,29	0,35	0,32
MCF-7wt [x-fach]	1,00	1,46	2,53	3,05	2,72
MCF-7kat Mn/GAP	0,10	0,17	0,24	0,22	0,32
MCF-7kat [x-fach]	1,00	1,74	2,39	2,20	3,19
Versuch IV					
MCF-7wt Mn/GAP	0,25	0,31	0,44	0,50	0,56
MCF-7wt [x-fach]	1,00	1,26	1,81	2,05	2,27
MCF-7kat Mn/GAP	0,10	0,14	0,21	0,26	0,41
MCF-7kat [x-fach]	1,00	1,38	2,08	2,51	4,00

Tabelle19: AP-1-SEAP Reporter Assay nach TNF- α Inkubation (Messwerte pro mg Protein)

Versuch I	Zeit [h]			
	0	6	9	24
MCF-7wt [Wert/mg]	0,9	4,8	8,8	33,6
MCF-7wt [x-fach]	1,0	5,6	10,2	38,9
MCF-7kat [Wert/mg]	0,8	2,4	4,8	12,6
MCF-7kat [x-fach]	1,0	3,1	6,2	16,1
Versuch II				
MCF-7wt [Wert/mg]	0,8	2,2	4,1	16,9
MCF-7wt [x-fach]	1,0	2,8	5,1	21,4
MCF-7kat [Wert/mg]	1,2	1,4	2,3	5,9
MCF-7kat [x-fach]	1,0	1,2	1,9	4,8
Versuch III				
MCF-7wt [Wert/mg]	1,0	2,6	4,1	15,5
MCF-7wt [x-fach]	1,0	2,7	4,2	15,9
MCF-7kat [Wert/mg]	1,2	1,5	2,0	5,5
MCF-7kat [x-fach]	1,0	1,3	1,7	4,7

Tabelle20: cMyc-SEAP Reporter Assay nach TNF- α Inkubation (Messwerte pro mg Protein)

Versuch I	Zeit [h]			
	0	6	9	24
MCF-7wt [Wert/mg]	0,4	0,9	1,5	3,5
MCF-7wt [x-fach]	1,0	2,4	3,9	8,9
MCF-7kat [Wert/mg]	0,4	0,5	0,7	1,1
MCF-7kat [x-fach]	1,0	1,5	1,9	3,3
Versuch II				
MCF-7wt [Wert/mg]	0,6	0,9	1,3	2,6
MCF-7wt [x-fach]	1,0	1,6	2,3	4,7
MCF-7kat [Wert/mg]	0,5	0,7	0,7	1,2
MCF-7kat [x-fach]	1,0	1,4	1,4	2,5
Versuch III				
MCF-7wt [Wert/mg]	0,7	1,8	2,9	6,8
MCF-7wt [x-fach]	1,0	2,7	4,3	10,0
MCF-7kat [Wert/mg]	0,5	0,8	1,1	1,8
MCF-7kat [x-fach]	1,0	1,4	2,0	3,4

Tabelle21: FOXO3a Expression nach 25 ng/ml TNF- α Inkubation (RT-PCR)
(Quotient densitometrischen Werte aus FOXO3a-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	Zeit [h]				
	0	3	6	9	16
FOXO3a/GAPDH	0,71	0,60	0,67	0,67	0,54
Werte [x-fach]	1,00	0,85	0,95	0,94	0,76
Versuch II					
FOXO3a/GAPDH	0,95	0,82	0,82	0,97	0,97
Werte [x-fach]	1,00	0,87	0,87	1,02	1,02
Versuch III					
FOXO3a/GAPDH	0,53	0,24	0,21	0,30	0,34
Werte [x-fach]	1,00	0,44	0,40	0,57	0,63

Tabelle22: Katalase Expression nach 25 ng/ml TNF- α Inkubation (Western)
(FOXO3a-Intensität nach densitometrischer Auswertung.)

Versuch I	Zeit [h]				
	0	1,5	3	5	8
Katalase	2045,07	1743,41	1336,00	1076,87	1092,13
Werte [x-fach]	1,00	0,85	0,65	0,53	0,53
Versuch II					
Katalase	447,85	252,14	243,85	239,75	242,08
Werte [x-fach]	1,00	0,56	0,54	0,54	0,54
Versuch III					
Katalase	2197,95	1992,30	1305,82	553,11	368,01
Werte [x-fach]	1,00	0,91	0,59	0,25	0,17

Tabelle23: 3xIRS-SEAP Assay, MCF-7wt, MCF-7FOXO3a, MCF-7FOXO3a-AAA
(SEAP-Menge pro OD das MTT Assays.)

	Versuch I	Versuch II	Versuch III
MCF-7wt SEAP/OD	291	7438	14804
MCF-7wt [x-fach]	1,0	25,5	50,8
MCF-7FOXO3a SEAP/OD	318	7196	14571
MCF-7FOXO3a [x-fach]	1,0	22,6	45,8
MCF-7FOXO3a-AAA SEAP/OD	467	6412	14604
MCF-7FOXO3a-AAA [x-fach]	1,0	13,7	31,3

Tabelle24: pSE-Luc Assay, MCF-7wt, MCF-7FOXO3a, MCF-7FOXO3a-AAA
(Luziferase Menge pro μ g Protein.)

	Versuch I	Versuch II	Versuch III
MCF-7wt Luc/ μ g Protein	1239	6567	11347
MCF-7wt [x-fach]	1,0	5,0	9,9
MCF-7FOXO3a Luc/ μ g Protein	1303	6367	9666
MCF-7FOXO3a [x-fach]	1,0	4,6	8,3
MCF-7FOXO3a-AAA Luc/ μ g Protein	1262	5468	8761
MCF-7FOXO3a-AAA [x-fach]	1,0	3,8	8,0

Tabelle25: TNF- α Viabilität

Versuch I	TNF- α [ng/ml]					
	0	1	5	10	25	50
MCF-7wt OD	0,555	0,535	0,411	0,371	0,320	0,302
MCF-7wt [%]	100,00	96,40	74,01	66,81	57,56	54,32
MCF-7FOXO3a-AAA OD	0,30	0,22	0,18	0,17	0,14	0,11
MCF-7FOXO3a-AAA [%]	100,00	73,60	58,72	56,82	46,31	38,48
Versuch II	0	10	25	50	75	100
MCF-7wt OD	0,62	0,58	0,43	0,41	0,34	0,32
MCF-7wt [%]	100,00	93,53	69,00	65,15	54,30	51,63
MCF-7FOXO3a-AAA OD	0,30	0,24	0,19	0,18	0,16	0,14
MCF-7FOXO3a-AAA [%]	100,00	78,01	63,54	58,67	52,71	47,62
Versuch III	0	10	25	50	75	100
MCF-7wt OD	0,70	0,66	0,49	0,44	0,38	0,38
MCF-7wt [%]	100,00	93,66	70,35	62,58	54,81	54,67
MCF-7FOXO3a-AAA OD	0,35	0,25	0,16	0,14	0,14	0,12
MCF-7FOXO3a-AAA [%]	100,00	71,84	46,74	41,09	39,66	35,44
Versuch IV	0	10	25	50	75	100
MCF-7wt OD	0,75	0,74	0,57	0,50	0,43	0,41
MCF-7wt [%]	100,00	98,75	75,91	67,01	57,70	55,08
MCF-7FOXO3a-AAA OD	0,42	0,29	0,21	0,19	0,16	0,14
MCF-7FOXO3a-AAA [%]	100,00	69,47	49,36	45,27	38,54	34,21

Tabelle26: Katalase Aktivitätsmessung (Hct-116) (Aktivität in Units pro mg Protein.)

	Versuch I	Versuch II	Versuch III
MCF-7wt	10	9	9
MCF-7kat	55	53	51

Tabelle27: Viabilität der Hct-116 Zellen nach H₂O₂ Inkubation

Versuch I	H ₂ O ₂ [μ M]					
	0	25	50	75	100	150
Hct-116wt OD	0,333	-	-	0,199	0,145	0,052
Hct-116wt [%]	100,00	-	-	59,76	43,39	15,54
Hct-116kat OD	0,178	-	-	0,123	0,106	0,066
Hct-116kat [%]	100,00	-	-	69,10	59,69	37,22
Versuch II	0	25	50	75	100	150
Hct-116wt OD	0,161	-	-	0,065	0,050	0,044
Hct-116wt [%]	100,00	-	-	40,00	30,70	27,44
Hct-116kat OD	0,135	-	-	0,071	0,062	0,060
Hct-116kat [%]	100,00	-	-	52,60	46,28	44,61
Versuch III	0	25	50	75	100	150
Hct-116wt OD	0,183	-	-	0,058	0,047	0,046
Hct-116wt [%]	100,00	-	-	31,51	25,38	25,10
Hct-116kat OD	0,137	-	-	0,063	0,057	0,051
Hct-116kat [%]	100,00	-	-	46,17	41,79	36,86
Versuch IV	0	25	50	75	100	150
Hct-116wt OD	0,378	0,382	0,272	0,183	0,113	0,072
Hct-116wt [%]	100,00	101,06	71,99	48,34	30,00	19,14
Hct-116kat OD	0,178	0,179	0,166	0,115	0,090	0,065
Hct-116kat [%]	100,00	100,70	93,52	64,65	50,56	36,48
Versuch V	0	25	50	75	100	150
Hct-116wt OD	0,377	0,388	0,306	0,183	0,134	0,063
Hct-116wt [%]	100,00	102,79	81,10	48,47	35,54	16,64
Hct-116kat OD	0,353	0,358	0,297	0,225	0,157	0,148
Hct-116kat [%]	100,00	101,42	84,07	63,74	44,41	42,00

Tabelle28: Viabilität der Hct-116 Zellen nach 3 h Doxorubicin Inkubation

Versuch I	Doxorubicin [μ M]				
	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,327	0,321	0,278	0,144	0,105
Hct-116wt [%]	100,00	97,94	84,87	43,85	32,09
Hct-116kat OD	0,185	0,184	0,156	0,076	0,071
Hct-116kat [%]	100,00	99,06	84,35	40,76	38,19
Versuch II	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,337	0,304	0,287	0,115	0,101
Hct-116wt [%]	100,00	90,20	85,23	34,08	29,84
Hct-116kat OD	0,218	0,161	0,164	0,075	0,082
Hct-116kat [%]	100,00	73,77	75,26	34,36	37,69
Versuch III	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,373	0,353	0,317	0,145	0,109
Hct-116wt [%]	100,00	94,63	85,11	38,97	29,11
Hct-116kat OD	0,207	0,198	0,173	0,096	0,079
Hct-116kat [%]	100,00	95,30	83,35	46,20	37,88
Versuch IV	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,392	0,387	0,317	0,146	0,109
Hct-116wt [%]	100,00	98,60	80,80	37,31	27,87
Hct-116kat OD	0,249	0,210	0,195	0,087	0,088
Hct-116kat [%]	100,00	84,52	78,29	35,08	35,18

Tabelle29: Katalase Expression nach 3 h & 24 h Doxorubicin Inkubation (RT-PCR)

(Quotient der densitometrischen Werte aus Katalase-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	Doxorubicin [μ M]			
	0	1	5	10
3h Kat/GAP	1,42	1,11	0,84	0,56
3h [x-fach]	1,00	0,78	0,59	0,40
24h Kat/GAP	0,93	0,77	0,67	0,63
24h [x-fach]	1,00	0,83	0,72	0,67
Versuch II				
3h Kat/GAP	1,98	1,65	1,01	0,62
3h [x-fach]	1,00	0,83	0,51	0,31
24h Kat/GAP	1,59	1,46	1,08	1,17
24h [x-fach]	1,00	0,92	0,68	0,74
Versuch III				
3h Kat/GAP	2,17	1,93	1,31	0,96
3h [x-fach]	1,00	0,89	0,61	0,44
24h Kat/GAP	1,06	0,90	0,74	0,65
24h [x-fach]	1,00	0,85	0,69	0,61

Tabelle30: Viabilität der Hct-116 Zellen nach 24 h Doxorubicin Inkubation

Versuch I	Doxorubicin [μM]				
	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,516	0,439	0,419	0,372	0,356
Hct-116wt [%]	100,00	85,17	81,19	72,08	69,07
Hct-116kat OD	0,254	0,235	0,226	0,183	0,195
Hct-116kat [%]	100,00	92,32	88,88	71,85	76,57
Versuch II	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,701	0,534	0,479	0,446	0,429
Hct-116wt [%]	100,00	76,21	68,33	63,66	61,13
Hct-116kat OD	0,535	0,423	0,346	0,293	0,266
Hct-116kat [%]	100,00	78,97	64,63	54,81	49,77
Versuch III	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,604	0,521	0,478	0,461	0,449
Hct-116wt [%]	100,00	86,37	79,25	76,39	74,32
Hct-116kat OD	0,630	0,534	0,509	0,342	0,359
Hct-116kat [%]	100,00	84,77	80,76	54,18	57,00
Versuch IV	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,738	-	0,519	0,439	0,411
Hct-116wt [%]	100,00	-	70,29	59,52	55,66
Hct-116kat OD	0,722	-	0,512	0,376	0,333
Hct-116kat [%]	100,00	-	70,89	52,11	46,08
Versuch IV	0	0,5	1	5	10
Hct-116wt OD	0,783	-	0,570	0,439	0,390
Hct-116wt [%]	100,00	-	72,88	56,13	49,78
Hct-116kat OD	0,713	-	0,496	0,371	0,318
Hct-116kat [%]	100,00	-	69,52	52,05	44,65

Tabelle31: MnSOD Expression nach 3 h & 24 h Doxorubicin Inkubation (RT-PCR)

(Quotient der densitometrischen Werte aus MnSOD-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
3h Mn/GAP	0,72	0,54	0,67	0,77
3h [x-fach]	1,00	0,75	0,94	1,08
24h Mn/GAP	0,36	0,28	0,18	0,16
24h [x-fach]	1,00	0,78	0,51	0,43
Versuch II				
3h Mn/GAP	2,01	1,90	1,51	1,24
3h [x-fach]	1,00	0,94	0,75	0,61
24h Mn/GAP	1,17	0,98	0,55	0,69
24h [x-fach]	1,00	0,84	0,48	0,59
Versuch III				
3h Mn/GAP	1,55	1,60	1,46	1,60
3h [x-fach]	1,00	1,03	0,94	1,03
24h Mn/GAP	0,91	1,09	0,45	0,48
24h [x-fach]	1,00	1,20	0,49	0,52

Tabelle32: Katalase Expression nach 3 h & 24 h Doxorubicin Inkubation (Western Blot)

(Katalase-Intensität nach densitometrischer Auswertung.)

Versuch I	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
3h Katalase	1290,39	1227,01	948,57	903,14
3h [x-fach]	1,00	0,95	0,74	0,70
24h Katalase	1102,25	992,94	892,11	900,37
24h [x-fach]	1,00	0,90	0,81	0,82
Versuch II				
3h Katalase	915,87	762,55	656,28	556,11
3h [x-fach]	1,00	0,83	0,72	0,61
24h Katalase	1274,76	1168,87	959,58	830,69
24h [x-fach]	1,00	0,92	0,75	0,65
Versuch III				
3h Katalase	994,34	944,94	639,49	559,94
3h [x-fach]	1,00	0,95	0,64	0,56
24h Katalase	1552,85	1194,48	676,40	1104,37
24h [x-fach]	1,00	0,77	0,44	0,71

Tabelle33: MnSOD Expression nach 3 h & 24 h Doxorubicin Inkubation (Western Blot)

(MnSOD Intensität nach densitometrischer Auswertung.)

Versuch I	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
3h MnSOD	1199,14	1340,22	1181,30	1256,43
3h [x-fach]	1,00	1,12	0,99	1,05
24h MnSOD	974,72	1234,43	902,89	875,45
24h [x-fach]	1,00	1,27	0,93	0,90
Versuch II				
3h MnSOD	1126,93	933,52	1541,34	865,49
3h [x-fach]	1,00	0,83	1,37	0,77
24h MnSOD	1009,91	1054,55	1037,33	932,31
24h [x-fach]	1,00	1,04	1,03	0,92
Versuch III				
3h MnSOD	513,87	701,17	1174,65	871,54
3h [x-fach]	1,00	1,36	2,29	1,70
24h MnSOD	1193,20	1201,66	1131,41	610,53
24h [x-fach]	1,00	1,01	0,95	0,51

Tabelle34: Daten DCF-Assay, 3 h & 24 h Doxorubicin (Angegeben sind die Messwerte als RFU.)

Versuch I	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
3h DCF/ μg Protein	31,09	37,50	66,38	50,10
3h [x-fach]	1,00	1,21	2,14	1,61
24h DCF/ μg Protein	35,75	113,63	71,18	125,23
24h [x-fach]	1,00	3,18	1,99	3,50
Versuch II				
3h DCF/ μg Protein	27,42	31,87	70,24	45,45
3h [x-fach]	1,00	1,16	2,56	1,66
24h DCF/ μg Protein	31,65	90,82	108,93	108,87
24h [x-fach]	1,00	2,87	3,44	3,44
Versuch III				
3h DCF/ μg Protein	29,19	36,14	54,39	44,48
3h [x-fach]	1,00	1,24	1,86	1,52
24h DCF/ μg Protein	32,63	76,50	74,30	104,12
24h [x-fach]	1,00	2,34	2,28	3,19

Tabelle35: NF- κ B-SEAP Assay, 3 h & 24 h Doxorubicin (Messwerte pro μg Protein)

3 h	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
Versuch I	367	419	447	232
Versuch II	262	320	395	211
Versuch III	272	294	385	153
24 h	0	1	5	10
Versuch I	557	642	287	201
Versuch II	373	587	208	126
Versuch III	493	342	144	122

Tabelle36: Expression von NF- κ B Zielgenen (RT-PCR)

(Quotienten der densitometrischen Werte aus XIAP/Bcl-xl/Bax/A20-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	XIAP				Bcl-xl			
	Doxorubicin [μM]				Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10	0	1	5	10
3h Target/GAP	0,88	0,95	1,19	0,83	1,09	1,62	1,83	0,39
3h [x-fach]	1,00	0,60	0,95	0,56	1,00	1,49	1,69	0,36
24h Target/GAP	0,78	0,77	0,14	0,12	1,08	1,55	0,16	0,19
24h [x-fach]	1,00	0,99	0,18	0,15	1,00	1,43	0,15	0,18
Versuch II								
3h Target/GAP	0,69	0,85	0,94	0,48	0,82	1,45	1,08	0,18
3h [x-fach]	1,00	1,23	1,36	0,70	1,00	1,76	1,32	0,23
24h Target/GAP	1,17	0,97	0,19	0,25	1,58	1,94	0,17	0,24
24h [x-fach]	1,00	0,83	0,16	0,21	1,00	1,23	0,11	0,15
Versuch III								
3h Target/GAP	0,86	0,51	0,82	0,48	0,94	1,66	2,05	0,42
3h [x-fach]	1,00	1,08	1,35	0,94	1,00	1,76	2,18	0,44
24h Target/GAP	0,89	1,08	0,12	0,13	1,22	1,61	0,19	0,36
24h [x-fach]	1,00	1,21	0,14	0,14	1,00	1,33	0,16	0,29

	Bax				A20			
	Doxorubicin [μM]				Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10	0	1	5	10
Versuch I								
3h Target/GAP	0,64	0,69	0,67	0,42	0,51	0,40	0,63	0,61
3h [x-fach]	1,00	1,08	1,05	0,65	1,00	0,79	1,23	1,18
24h Target/GAP	0,98	0,97	0,39	0,27	0,65	0,54	0,18	0,02
24h [x-fach]	1,00	0,99	0,40	0,28	1,00	0,83	0,27	0,03
Versuch II								
3h Target/GAP	0,33	0,74	0,54	0,26	0,27	0,20	0,32	0,26
3h [x-fach]	1,00	2,21	1,61	0,79	1,00	0,74	1,19	0,97
24h Target/GAP	1,09	0,89	0,41	0,29	0,40	0,60	0,29	0,02
24h [x-fach]	1,00	0,82	0,38	0,27	1,00	1,51	0,72	0,05
Versuch III								
3h Target/GAP	0,71	0,93	0,89	0,61	0,46	0,44	0,79	0,62
3h [x-fach]	1,00	1,31	1,25	0,85	1,00	0,97	1,72	1,34
24h Target/GAP	0,52	0,71	0,24	0,40	0,46	0,45	0,26	0,08
24h [x-fach]	1,00	1,38	0,47	0,77	1,00	0,97	0,57	0,18

Tabelle37: Viabilität nach 3 h & 24 h Doxorubicin Inkubation (NR-Test)

	Doxorubicin [μM]				
	0	0,5	1	5	10
Versuch I					
3h OD	0,565	0,567	0,533	0,285	0,224
3h [%]	100,00	100,44	94,42	50,38	39,66
24h OD	0,797	0,629	0,543	0,451	0,404
24h [%]	100,00	78,93	68,05	56,51	50,61
Versuch II					
3h OD	0,570	0,535	0,508	0,251	0,207
3h [%]	100,00	93,81	89,07	44,05	36,24
24h OD	0,544	0,461	0,384	0,275	0,253
24h [%]	100,00	84,65	70,63	50,46	46,46
Versuch III					
3h OD	0,546	0,513	0,526	0,317	0,277
3h [%]	100,00	93,95	96,33	58,16	50,82
24h OD	0,816	0,663	0,538	0,467	0,428
24h [%]	100,00	81,31	65,98	57,25	52,44
Versuch IV					
3h OD	0,538	0,513	0,503	0,306	0,279
3h [%]	100,00	95,44	93,54	56,86	51,88
24h OD	0,312	0,235	0,218	0,147	0,154
24h [%]	100,00	75,36	70,06	47,27	49,28

Tabelle38: Viabilität nach 3 h & 24 h Doxorubicin Inkubation (MTT-Assay)

	Doxorubicin [μM]					
	0	0,5	1	2,5	5	10
Versuch I						
3h OD	0,708	0,686	0,581	0,429	0,309	0,249
3h [%]	100,00	96,86	82,06	60,56	43,68	35,10
24h OD	1,396	1,070	0,796	0,649	0,679	0,656
24h [%]	100,00	76,68	56,99	46,52	48,61	46,98
Versuch II						
3h OD	0,707	0,621	0,550	0,412	0,275	0,236
3h [%]	100,00	87,80	77,77	58,25	38,81	33,33
24h OD	1,506	1,091	0,905	0,718	0,698	0,617
24h [%]	100,00	72,44	60,10	47,67	46,32	40,98
Versuch III						
3h OD	0,823	0,689	0,555	0,454	0,332	0,266
3h [%]	100,00	83,63	67,35	55,15	40,36	32,31
24h OD	0,545	0,343	0,275	0,293	0,244	0,211
24h [%]	100,00	62,89	50,37	53,67	44,82	38,72
Versuch IV						
3h OD	0,778	0,713	0,612	0,448	0,363	0,283
3h [%]	100,00	91,65	78,61	57,60	46,58	36,40
24h OD	0,510	0,352	0,278	0,291	0,233	0,206
24h [%]	100,00	69,02	54,56	57,01	45,69	40,29

Tabelle39: AP-1-SEAP Assay, 3 h & 24 h Doxorubicin(3 h Messwerte pro μg Protein, 24 h Werte in Bezug zur Viabilität nach MTT Assay)

3 h	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
Versuch I	52,3	56,3	82,7	55,5
Versuch II	691,5	844,1	1021,3	572,2
Versuch III	495,5	535,1	570,5	312,1
24 h	0	1	5	10
Versuch I	44956	104855	32790	31300
Versuch II	60013	76383	32608	34867
Versuch III	36278	100322	23915	16858

Tabelle40: Expression von Bax (Western Blot) (Bax-Intensität nach densitometrischer Auswertung.)

Versuch I	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
3h Bax	1184,73	1989,90	1394,97	972,64
3h [x-fach]	1,00	1,68	1,18	0,82
24h Bax	1212,19	1673,71	815,56	864,17
24h [x-fach]	1,00	1,38	0,67	0,71
Versuch II	0	1	5	10
3h Bax	1555,30	2294,45	2096,80	1241,01
3h [x-fach]	1,00	1,48	1,35	0,80
24h Bax	1286,23	1547,10	826,32	823,10
24h [x-fach]	1,00	1,20	0,64	0,64
Versuch III	0	1	5	10
3h Bax	1320,64	1960,28	1459,34	765,66
3h [x-fach]	1,00	1,48	1,11	0,58
24h Bax	1060,45	1811,88	697,38	580,83
24h [x-fach]	1,00	1,71	0,66	0,55

Tabelle41: NFAT-1-SEAP Assay, 3 h & 24 h Doxorubicin(3 h Messwerte pro μg Protein, 24 h Werte pro OD nach MTT Assay)

3 h	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
Versuch I	452	371	304	164
Versuch II	599	342	274	236
Versuch III	420	308	231	149
Versuch IV	474	326	257	161
24 h	0	1	5	10
Versuch I	34675	37556	18363	11432
Versuch II	37753	34403	19953	12949
Versuch III	44619	44040	21651	14118
Versuch IV	47222	47308	22524	14991

Tabelle42: c-Myc-SEAP Assay, 3 h & 24 h Doxorubicin(3 h Messwerte pro μg Protein, 24 h Werte pro OD nach MTT Assay)

3 h	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
Versuch I	18,4	17,3	36,2	47,1
Versuch II	13,6	13,3	31,0	45,9
Versuch III	11,7	13,0	24,5	47,8
24 h	0	1	5	10
Versuch I	9627	11318	7960	5797
Versuch II	8998	9698	7286	6899
Versuch III	16258	25098	12339	12089

Tabelle43: Daten APO-ONE Assay, 3 h & 24 h Doxorubicin

Versuch I	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
3 h	241960	209465	413237	568883
24 h	276421	332535	179395	187812
Versuch II	0	1	5	10
3 h	304068	185801	422838	497198
24 h	317571	330738	187064	202868
Versuch III	0	1	5	10
3 h	95276	96841	267302	649747
24 h	240444	331468	223122	195580
Versuch IV	0	1	5	10
3 h	98712	100748	312811	591956
24 h	242775	339229	255260	253786

Tabelle44: Daten Multi-Tox Fluor Assay, 3 h & 24 h Doxorubicin

Versuch I	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
3h viabel	56910	42055	17021	23101
3h tot	21762	29289	69087	37216
24 h viabel	67460	31931	31759	27562
24 h tot	25240	54458	25974	27977
Versuch II	0	1	5	10
3h viabel	31855	29003	17231	14281
3h tot	16277	15670	37744	49927
24 h viabel	38152	27304	20989	20047
24 h tot	17239	27087	20112	28638
Versuch III	0	1	5	10
3h viabel	48327	40924	27808	24606
3h tot	23300	28255	64704	94506
24 h viabel	48414	33424	27650	26556
24 h tot	26373	38083	22780	28184
Versuch IV	0	1	5	10
3h viabel	45032	39144	22120	20322
3h tot	23357	27799	60503	67763
24 h viabel	50462	34890	28275	26170
24 h tot	26145	38524	24549	32373

Tabelle45: Expression von p53 und p21 (RT-PCR)

(Quotienten der densitometrischen Werte aus p53/p21-Intensität und GAPDH-Intensität.)

Versuch I	p21				p53			
	Doxorubicin [μM]				Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10	0	1	5	10
3h Target/GAP	0,02	0,09	0,20	0,03	0,68	0,72	0,79	0,82
3h [x-fach]	1,00	4,32	9,08	1,45	1,00	1,07	1,17	1,22
24h Target/GAP	0,06	0,40	0,03	0,03	0,87	1,02	0,97	0,75
24h [x-fach]	1,00	6,26	0,42	0,44	1,00	1,17	1,12	0,86
Versuch II	0	1	5	10	0	1	5	10
3h Target/GAP	0,06	0,31	0,30	0,05	0,89	0,90	0,91	1,00
3h [x-fach]	1,00	5,16	5,01	0,79	1,00	1,02	1,03	1,13
24h Target/GAP	0,03	0,17	0,01	0,01	0,90	1,18	0,93	0,74
24h [x-fach]	1,00	5,95	0,35	0,26	1,00	1,15	0,86	0,92
Versuch III	0	1	5	10	0	1	5	10
3h Target/GAP	0,09	0,34	0,62	0,18	0,99	1,09	1,17	1,13
3h [x-fach]	1,00	3,96	7,25	2,14	1,00	1,11	1,18	1,15
24h Target/GAP	0,03	0,41	0,02	0,01	1,04	1,09	0,90	0,94
24h [x-fach]	1,00	11,85	0,60	0,34	1,00	1,04	0,86	0,90

Tabelle46: SEAP-Control Assay, 24 h Doxorubicin (Messwerte pro μg Protein)

Dox [μM]	Zeit [h]			
	0	2	6	24
0	6,0	31,8	114,2	635,7
1	12,5	38,9	136,5	719,3
5	12,8	40,1	118,9	542,1
10	9,6	45,2	129,3	424,8

Tabelle47: Caspase Aktivierung nach 3 h Doxorubicin Inkubation

Caspase-3/-7	Doxorubicin [μM]			
	0	1	5	10
Versuch I	1,0	4,0	18,9	33,1
Versuch II	2,2	6,4	27,0	32,9
Versuch III	1,0	5,3	25,8	31,5
Caspase-8/-10	0	1	5	10
Versuch I	3,1	3,7	7,1	10,4
Versuch II	2,8	4,6	8,0	9,5
Versuch III	2,3	3,9	9,3	10,4
Caspase-9	0	1	5	10
Versuch I	4,0	4,0	5,8	5,8
Versuch II	3,7	4,4	5,9	5,9
Versuch III	4,2	4,4	7,1	5,9

Tabelle48: Daten Wachstumskurve Hct-116FOXO4 Klone (OD-Werte bei 560 nm)

Hct-116wt	Zeit [h]				
	24	48	72	96	144
Versuch I	0,063	0,110	0,174	0,260	0,623
Versuch II	0,061	0,107	0,168	0,260	0,689
Versuch III	0,061	0,118	0,179	0,252	0,615
Versuch IV	0,061	0,107	0,177	0,275	0,558
Hct-116leerer Vektor					
Versuch I	0,072	0,145	0,201	0,225	0,707
Versuch II	0,078	0,140	0,203	0,238	0,660
Versuch III	0,072	0,144	0,203	0,250	0,666
Versuch IV	0,077	0,146	0,188	0,227	0,736
Hct-116FOXO4wt					
Versuch I	0,073	0,122	0,174	0,247	0,664
Versuch II	0,077	0,124	0,182	0,253	0,678
Versuch III	0,077	0,125	0,184	0,256	0,702
Versuch IV	0,074	0,125	0,174	0,254	0,673
Hct-116FOXO4nukleär					
Versuch I	0,080	0,128	0,189	0,256	0,698
Versuch II	0,075	0,124	0,189	0,245	0,686
Versuch III	0,079	0,125	0,191	0,248	0,701
Versuch IV	0,079	0,125	0,190	0,248	0,594
Hct-116FOXO4JNK-mut					
Versuch I	0,076	0,123	0,184	0,232	0,628
Versuch II	0,071	0,136	0,184	0,256	0,605
Versuch III	0,072	0,131	0,194	0,254	0,672
Versuch IV	0,079	0,122	0,178	0,234	0,605

Tabelle49: Daten FACS-Analyse Hct-116FOXO4 Klone (Prozentwerte der einzelnen Gates.)

Hct-116wt	G0/G1	S	G2/M	sub G0/G1
Versuch I	58,53	14,22	25,53	1,72
Versuch II	59,00	15,98	23,44	1,58
Hct-116 mock				
Versuch I	59,83	12,13	26,61	1,43
Versuch II	61,24	9,29	27,27	2,20
Hct-116FOXO4wt				
Versuch I	54,87	16,58	25,23	3,31
Versuch II	59,14	9,78	26,79	4,28
Hct-116FOXO4nukleär				
Versuch I	55,03	17,72	23,88	3,38
Versuch II	59,40	18,18	18,61	3,81
Hct-116FOXO4JNK-mut				
Versuch I	58,03	12,59	26,89	2,50
Versuch II	57,74	11,42	27,29	3,55

Tabelle50: Daten APO-ONE Assay Hct-116FOXO4 Klone

	leerer Vektor	FOXO4wt	FOXO4nukleär	FOXO4JNK-mut
Versuch I	123566	135514	102547	107694
Versuch II	101498	104201	105094	92847
Versuch III	101598	117323	114688	108314

Tabelle51: Daten 3xIRS-SEAP Assay, FOXO4wt(1) & FOXO4JNK-mut (Messwerte pro µg Protein.)

	Versuch I	Versuch II	Versuch III
FOXO4wt(1) SEAP/µg	119,31	141,35	122,85
FOXO4wt(1) [x-fach]	1,00	1,00	1,00
FOXO4JNK-mut SEAP/µg	1,5	1,5	4,5
FOXO4JNK-mut [x-fach]	0,05	0,07	0,03

Tabelle52: Daten pSE-Luc Luziferase Assay, FOXO4wt(1) & FOXO4JNK-mut (Luziferasewerte pro µg Protein.)

	empty vector	FOXO4wt(1)	FOXO4JNK-mut
Versuch I	2,8	47,1	29,5
Versuch II	3,3	52,5	46,7
Versuch III	2,5	59,6	29,0
Versuch IV	1,9	69,9	26,7

Tabelle53: Viabilität der Hct-116FOXO4 Klone nach 3 h Doxorubicin Inkubation

Versuch I	Doxorubicin [μM]					
	0	0,5	1	2,5	5	10
Hct-116wt OD	1,430	1,350	1,482	1,166	0,704	0,514
Hct-116wt [%]	100	94,40	103,68	81,58	49,24	35,98
Hct-116FOXO4wt(1) OD	1,312	1,310	1,038	0,852	0,394	0,352
Hct-116FOXO4wt(1) [%]	100	99,85	79,16	64,93	30,01	26,86
Hct-116FOXO4JNK-mut OD	1,237	1,179	0,975	0,654	0,293	0,356
Hct-116FOXO4JNK-mut [%]	100	95,26	78,80	52,86	23,65	28,80
Versuch II						
Hct-116wt OD	1,483	1,309	1,492	1,147	0,690	0,536
Hct-116wt [%]	100	88,27	100,58	77,33	46,52	36,13
Hct-116FOXO4wt(1) OD	1,248	1,180	0,936	0,690	0,361	0,375
Hct-116FOXO4wt(1) [%]	100	94,50	74,98	55,27	28,89	30,04
Hct-116FOXO4JNK-mut OD	1,175	1,047	0,895	0,580	0,248	0,337
Hct-116FOXO4JNK-mut [%]	100	89,08	76,14	49,36	21,11	28,68
Versuch III						
Hct-116wt OD	1,744	1,580	1,726	1,345	0,722	0,727
Hct-116wt [%]	100	90,58	98,99	77,12	41,42	41,67
Hct-116FOXO4wt(1) OD	1,522	1,443	1,169	0,802	0,384	0,426
Hct-116FOXO4wt(1) [%]	100	94,79	76,81	52,68	25,25	27,96
Hct-116FOXO4JNK-mut OD	1,443	1,301	0,989	0,697	0,296	0,448
Hct-116FOXO4JNK-mut [%]	100	90,20	68,58	48,31	20,49	31,03
Versuch IV						
Hct-116wt OD	1,325	1,248	1,542	1,052	0,605	0,684
Hct-116wt [%]	100	94,24	116,41	79,39	45,70	51,64
Hct-116FOXO4wt(1) OD	1,355	1,245	1,021	0,651	0,349	0,427
Hct-116FOXO4wt(1) [%]	100	91,83	75,33	48,06	25,77	31,51
Hct-116FOXO4JNK-mut OD	1,294	1,140	0,852	0,535	0,284	0,318
Hct-116FOXO4JNK-mut [%]	100	88,10	65,84	41,34	21,97	24,60

Tabelle54: Viabilität von Hct-116wt & DN-AKT nach 3 h Doxorubicin Inkubation

Versuch I	Doxorubicin [μM]					
	0	0,5	1	2,5	5	10
Hct-116wt OD	1,722	1,673	1,539	1,102	0,466	0,594
Hct-116wt [%]	100	97,19	89,41	64,03	27,09	34,50
Hct-116DN-AKT OD	0,818	0,731	0,628	0,257	0,105	0,114
Hct-116DN-AKT [%]	100	89,44	76,84	31,39	12,80	13,98
Versuch II						
Hct-116wt OD	1,936	1,844	1,758	1,356	0,649	0,402
Hct-116wt [%]	100	95,26	90,82	70,05	33,51	20,77
Hct-116FOXO4wt(1) OD	0,800	0,813	0,733	0,414	0,122	0,112
Hct-116FOXO4wt(1) [%]	100	101,67	91,58	51,75	15,21	14,00
Versuch III						
Hct-116wt OD	1,604	1,513	1,459	1,114	0,623	0,483
Hct-116wt [%]	100	103,61	99,93	76,26	42,66	33,07
Hct-116FOXO4wt(1) OD	1,355	1,219	1,084	0,772	0,336	0,316
Hct-116FOXO4wt(1) [%]	100	89,97	79,96	56,96	24,79	23,34

Tabelle55: Daten APO-ONE Assay, Hct-116FOXO4 Klone nach 3 h Doxorubicin

Versuch I	Doxorubicin [μM]		
	0	5	10
Hct-116wt Wert/MTT	475297	1835682	3116343
Hct-116wt [x-fach]	1,00	3,86	6,56
Hct-116nukleär Wert/MTT	221880	1975403	3191249
Hct-116nukleär Wert/MTT	1,00	8,90	14,38
Versuch II			
Hct-116wt Wert/MTT	617774	2630648	3081456
Hct-116wt [x-fach]	1,00	4,26	4,99
Hct-116nukleär Wert/MTT	328821	2263195	3192528
Hct-116nukleär Wert/MTT	1,00	6,88	9,71
Versuch III			
Hct-116wt Wert/MTT	181980	907326	1198682
Hct-116wt [x-fach]	1,00	4,99	6,59
Hct-116nukleär Wert/MTT	104750	1216754	2016484
Hct-116nukleär Wert/MTT	1,00	11,62	19,25

Tabelle56: Daten 3xIRS-SEAP Assay, EGFP-FOXO4 Klone (Messwerte pro OD Wert des MTT Assays.)

Versuch I	wt	EGFP-C1	EGFP-FOXO4wt Klon			EGFP-FOXO4-nukleär Klon		
			2-1	4-2	6-3	1-1	3-2	5-3
Versuch I	75,51	81,69	893,16	761,80	1025,56	4185,70	4804,99	3973,44
Versuch II	69,81	79,26	903,51	829,00	1633,52	3933,71	5076,27	3923,69

Tabelle57: Viabilität der Hct-116FOXO4 Klone nach 3 h Doxorubicin Inkubation

Versuch I	Doxorubicin [μM]					
	0	0,5	1	2,5	5	10
Hct-116wt OD	1,745	1,700	1,673	1,263	0,654	0,726
Hct-116wt [%]	100	97,38	95,84	72,35	37,47	41,60
Hct-116FOXO4wt(2) OD	1,418	1,309	1,283	0,808	0,337	0,329
Hct-116FOXO4wt(2) [%]	100	92,34	90,48	56,96	23,74	23,20
Hct-116FOXO4nukleär OD	1,088	0,959	0,834	0,539	0,163	0,175
Hct-116FOXO4nukleär [%]	100	88,17	76,68	49,56	14,99	16,12
Versuch II						
Hct-116wt OD	1,588	1,568	1,565	1,200	0,555	0,615
Hct-116wt [%]	100	98,74	98,51	75,57	34,96	38,70
Hct-116FOXO4wt(2) OD	1,300	1,285	1,170	0,787	0,275	0,223
Hct-116FOXO4wt(2) [%]	100	98,82	90,03	60,56	21,13	17,15
Hct-116FOXO4nukleär OD	1,073	0,973	0,865	0,509	0,129	0,128
Hct-116FOXO4nukleär [%]	100	90,71	80,61	47,45	12,03	11,90
Versuch III						
Hct-116wt OD	1,934	1,924	1,792	1,454	0,704	0,902
Hct-116wt [%]	100	99,48	92,69	75,21	36,43	46,65
Hct-116FOXO4wt(2) OD	1,673	1,651	1,496	1,128	0,487	0,631
Hct-116FOXO4wt(2) [%]	100	98,70	89,47	67,45	29,10	37,75
Hct-116FOXO4nukleär OD	1,483	1,434	1,211	0,859	0,289	0,461
Hct-116FOXO4nukleär [%]	100	96,72	81,66	57,92	19,52	31,12
Versuch IV						
Hct-116wt OD	1,939	1,888	1,794	1,437	0,767	0,998
Hct-116wt [%]	100	97,38	92,51	74,12	39,54	51,48
Hct-116FOXO4wt(2) OD	1,625	1,577	1,438	1,017	0,453	0,539
Hct-116FOXO4wt(2) [%]	100	97,01	88,48	62,58	27,87	33,16
Hct-116FOXO4nukleär OD	1,321	1,239	1,086	0,714	0,301	0,377
Hct-116FOXO4nukleär [%]	100	93,77	82,21	54,04	22,81	28,54

Tabelle58: Daten 3xIRS-SEAP Assay, FOXO4wt(2) & FOXO4nukleär
(Messwerte pro OD Wert des MTT Assays.)

	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Versuch IV
leerer Vektor SEAP/MTT	301	318	116	115
leerer Vektor [x-fach]	1,0	1,0	1,0	1,0
FOXO4wt(2) SEAP/MTT	4141	3836	3816	5139
FOXO4wt(2) [x-fach]	13,7	12,0	33,0	44,9
FOXO4nukleär SEAP/MTT	12095	10158	8068	9104
FOXO4nukleär [x-fach]	40,2	31,9	69,7	79,5

Tabelle59: Daten pSE-Luc Luziferase Assay, FOXO4wt(2) & FOXO4nukleär
(Luziferasewerte pro μg Protein.)

	empty vector	FOXO4wt(2)	FOXO4nukleär
Versuch I	2,8	25,5	43,3
Versuch II	3,3	26,5	40,1
Versuch III	2,5	27,0	41,0
Versuch IV	1,9	31,0	36,7

Tabelle60: Viabilität der HepG2 Zellen nach 3 h Doxorubicin Inkubation

Versuch I	Doxorubicin [μM]						
	0	1	2,5	5	10	15	25
HepG2wt OD	1,024	0,954	0,976	0,771	0,679	0,755	0,733
HepG2wt [%]	100,00	93,16	95,31	75,28	66,33	73,72	71,57
HepG2FOXO4wt(1) OD	1,070	0,901	0,763	0,643	0,580	0,593	0,526
HepG2FOXO4wt(1) [%]	100,00	84,21	71,29	60,11	54,16	55,37	49,11
Versuch II							
HepG2wt OD	0,884	0,829	0,917	0,804	0,606	0,649	0,682
HepG2wt [%]	100,00	93,78	103,77	90,91	68,51	73,38	77,19
HepG2FOXO4wt(1) OD	1,063	0,885	0,823	0,595	0,502	0,569	0,539
HepG2FOXO4wt(1) [%]	100,00	83,25	77,45	55,94	47,19	53,50	50,71
Versuch III							
HepG2wt OD	0,990	0,887	1,002	0,848	0,662	0,692	0,712
HepG2wt [%]	100,00	89,53	101,14	85,66	66,85	69,84	71,93
HepG2FOXO4wt(1) OD	1,080	0,947	0,797	0,641	0,528	0,553	0,569
HepG2FOXO4wt(1) [%]	100,00	87,68	73,79	59,40	48,93	51,25	52,73

Veröffentlichungen

Publikationen

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., and Kahl, R. (2008) Catalase overexpression impairs TNF-alpha induced NF-kB activation and sensitizes MCF-7 cells against TNF-alpha. *J Cell Biochem* **103**: 1497-1511.

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Unfried, K., Kampkötter, A., Wätjen, W., and Kahl, R. (2008) The forkhead transcription factor FOXO4 sensitizes cancer cells to doxorubicin mediated cytotoxicity. *Carcinogenesis* doi:10.1093/carcin/bgn184.

Vorträge

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., Kahl, R. (2008) PI3K/AKT signaling and FOXO4-mediated apoptosis in Doxorubicin treated human colon carcinoma cells. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Suppl to Vol 377, 49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Posterpräsentationen

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., Kahl, R. (2005): Catalase and its effect on the sensitivity of human cell lines against oxidative stress. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Suppl to Vol 371, 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., Kahl, R. (2006): Effect of catalase overexpression on the sensitivity of human breast carcinoma cells against TNF- α . *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Suppl to Vol 372, 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Kahl, R., **Lüpertz, R.**, Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W. (2006): Relationship between catalase expression, NFkB activation and TNF-alpha induced cytotoxicity in MCF7 cells. *Free Radical Research*, 2006; Vol 40 Suppl 1, 15-19 August 2006, XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research, Davos

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., Kahl, R. (2007): Catalase overexpression and its role in Doxorubicin induced apoptotic signalling in human cells. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Suppl to Vol 375, 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., Kahl, R. (2007): Doxorubicin induced apoptotic signalling in human Hct-116 colon carcinoma cells. *Abstractband*, Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Düsseldorf

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., Kahl, R. (2007): Doxorubicin induced apoptotic signalling in human Hct-116 colon carcinoma cells. *1st Mini-Symposium of the graduate college 1427*: „Food, gut and the immune system: A challenge in environmental medicine.“, Düsseldorf

Lüpertz, R., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Wätjen, W., Kahl, R. (2008): Doxorubicin induced apoptotic signalling in human Hct-116 colon carcinoma cells. *2nd Mini-Symposium of the graduate college 1427*: „Nutrition and Health: Intestinal effects of Food Constituents.“, Düsseldorf (Posterpreis, 2. Platz)

Danksagung

Zu aller erst möchte ich Frau Prof. Kahl danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation im Institut für Toxikologie anzufertigen. Ich danke ihr für das Interesse an meiner Arbeit und die Diskussionsbereitschaft. Ferner danke ich Herrn Prof. Wunderlich für die Bereitschaft nach meiner Diplomarbeit auch meine Dissertation zu betreuen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Yvonne Chovolou bedanken. Die regelmäßig stattfindenden Besprechungen, das gemeinsame Interpretieren von Ergebnissen, Paper Sessions und das Brainstorming für neue Versuche haben am Gelingen dieser Arbeit einen sehr sehr großen Anteil gehabt.

Ich danke allen weiteren ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Instituts für Toxikologie für das angenehme Arbeitsklima, die lustigen Mittags- und Inkubationspausen, so manche einfallsreiche Laboraktion und unvergessliche Seminare und Kongress Reisen. Mein besonderer Dank gilt:

- PD Dr. Wim Wätjen und PD Dr. Andreas Kampkötter für die Diskussionsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit.
- Kerstin Wolters und Sandra Ohler für die vielen Tipps und Tricks bei den Tücken des Laboralltags und für ihr Engagement im Hintergrund, durch das, für manche unbemerkt, die Labore in einem arbeitsfähigen Zustand gehalten werden.
- Hermine Kannengießler für die Unterstützung bei den Aktivitätsmessungen.
- Martina Bennat dafür, dass sie mir mit Ihrer Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit viele bürokratische Hürden aus dem Weg geräumt hat.
- Den anderen beiden Teilern des Doktoranden Trios und den restlichen Bewohnern unseres Arbeitsraumes für die gute Stimmung und den fachlichen Austausch. Insbesondere danke ich: Sven Ruhl für die fast tägliche gute Laune, die unaufgefordert durch fröhliches Pfeifen im Labor und auch bei den Toxkursen verbreitet wurde. Ricarda Rohrig für die vielen netten (fachlichen und nichtfachlichen) Gespräche, die Reisen zu den Toxkursen und die Bestätigung, dass aus Kollegen auch Freunde werden können.

Des Weiteren danke ich allen Mitgliedern des Graduierten Kollegs 1427, dem ich seit Oktober 2006 als Kollegiatin angehöre, für die Diskussionsbereitschaft bei den Kolloquien und für die gute Atmosphäre. Ich danke ausserdem den Basketball Mädels, die immer im richtigen Augenblick mit Spaß und Teamgeist dazu beigetragen haben, dass Basketball genau der Ausgleich war, den ich brauchte.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die trotz manch fehlendem Einblicks in die Materie immer Interesse an meiner Arbeit zeigte. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums und vor allem während der Dissertation immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden verwandt. Zitate wurden kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den