



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7434

# **Die Inhibition von GSK-3 löst Apoptose in Tumorzellen aus und hemmt das Tumorstwachstum im Tiermodell**

**G. Marinescu**

**Institut für Toxikologie und Genetik**

**August 2008**



**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft  
Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7434

**Die Inhibition von GSK-3 löst Apoptose  
in Tumorzellen aus und hemmt das Tumorwachstum  
im Tiermodell**

Gabriela Marinescu  
Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe  
2008

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-074345

# **Die Inhibition von GSK-3 löst Apoptose in Tumorzellen aus und hemmt das Tumorwachstum im Tiermodell**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Gabriela Marinescu**

aus Bukarest/Rumänien

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse  
Referent: PD Dr. Christine Blattner  
Korreferent: Prof. Dr. Doris Wedlich  
Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2008



## Zusammenfassung

Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) ist eine Serin/Threonin Kinase, die eine zentrale Rolle in vielen Signalwegen (Insulinsynthese, Wnt-Signalweg u.s.w.) spielt. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Inhibition von GSK-3, Apoptose in p53-positiven und -negativen Tumorzellen induzierte. Die Inaktivierung von GSK-3 führt unter anderem zur Stabilisierung des p53-Proteins, das als Transkriptionsfaktor für anti-proliferative und pro-apoptische Gene einen wesentlichen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt.

In proliferierenden Zellen ist die p53-Proteinmenge niedrig und das Protein inaktiv. Wird die Menge des p53-Proteins erhöht, indem zum Beispiel sein Abbau verhindert wird, so werden die p53-abhängigen Zielgene transkribiert und Zellzyklusarrest oder Apoptose ausgelöst.

Da die Inaktivierung von GSK-3 in vorausgehenden Experimenten zur Mengenzunahme von transkriptionell aktivem p53 führte, lag die Hypothese nahe, dass die Inhibition von GSK-3 die Zellproliferation inhibieren könnte.

Die Behandlung unterschiedlicher p53-positiver und -negativer Zelllinien mit den gängigen GSK-3-Inhibitoren Lithiumchlorid oder Alsterpaullon hat eine entscheidende Wirkung auf die Zellproliferation, da sie den programmierten Zelltod in Tumorzellen einleiten.

In Anwesenheit von LiCl zeigten die Zellen die typischen Apoptosemerkmale wie Caspase-3-Aktivierung, PARP-Spaltung und DNS-Fragmentierung. Eine eindeutige p53-Abhängigkeit konnte ich in meinen Experimenten nicht feststellen, obwohl die Caspase-3-, PARP-Aktivierung und DNS-Fragmentierung in den p53-negativen Zellen schwächer war. Das Ausschalten der beiden Isoformen GSK-3 $\alpha$  und - $\beta$  durch Transfektion spezifischer siRNA-Sequenzen führte ebenfalls zur Aktivierung von Caspase-3, was mich schlussfolgern ließ, dass die Inhibition dieser Kinase die Apoptose hervorruft.

Um dieses Ergebnis auch *in vivo* nachweisen zu können, habe ich syngene Ratten mit LiCl und NaCl vorbehandelt, mit MT450-Mammakarzinomzellen gespritzt, um die Tumorentwicklung zu stimulieren, und anschließend das Tumorwachstum über mehrere Wochen verfolgt. Die tägliche Behandlung der Tiere mit LiCl hat ihr Tumorwachstum stark beeinträchtigt und löste Apoptose in den Tumorzellen aus. Die anschließenden histologischen Untersuchungen der Tumore zeigten, dass die mit LiCl behandelten Ratten, im Vergleich zu den mit NaCl behandelten beziehungsweise den Kontrolltieren, eine erhöhte Apoptoserate aufwiesen.

Diese Reaktion der Tumorzellen lässt hoffen, dass die Inhibition von GSK-3 eines Tages in der Tumorthherapie eingesetzt werden kann, um selektiv die malignen Zellen in einem Organismus zu töten.

## **Abstract**

### **The inhibition of GSK-3 induces apoptosis in tumor cells and reduces the tumorgrowth in the animal model**

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a serine/threonine kinase which play a central role in many signalling pathways like insulin pathway or Wnt-signalling.

In my PhD-work I was able to show that the inhibition of GSK-3 is inducing apoptosis in p53-positive and -negative tumor cells. The inactivation of GSK-3 can lead to the stabilization of the p53 tumor suppressor protein which activates anti-proliferative and pro-apoptotic genes and has an influence on cell proliferation.

In proliferating cells is the p53 protein inactive and its amount is kept low. If the p53 protein accumulates in the cell because it is not degraded anymore, p53 target genes are being activated and cell cycle arrest or apoptosis occurs.

In previous experiments was shown that the inhibition of GSK-3 lead to the activation of the p53 protein. My hypothesis was that GSK-3 inhibition could have an influence on cell proliferation. The treatment of different p53-positive and -negative cell lines with the well known GSK-3 inhibitors lithium chloride and alsterpaullone triggered the programmed cell death pathway in tumor cells. After LiCl treatment the cells showed the common apoptotic features like caspase-3 activation, PARP-cleavage and DNA-fragmentation. In my experiments I could not detect a p53 dependency, although caspase-3- and PARP-cleavage and DNA-fragmentation were weaker and occurred at later time points. The specific silencing of the two GSK-3 isoforms over siRNA sequences also had an influence on the caspase-3 activation. I was able to show that the inhibition of GSK-3 kinase is inducing apoptosis in tumor cells.

In order to confirm this results also *in vivo*, I performed an animal experiment. I pre-treated rats with LiCl or NaCl as a control, I injected them with MT450 breast cancer cells for tumor development and I monitored the tumor growth for several weeks. The daily treatment of the rats with LiCl had a big influence on the tumor growth and also induced apoptosis in the tumor cells. The histological stainings of the tumors showed that in the LiCl-treated animals, a higher apoptotic rate occurred compared to the NaCl-treated or non-treated animals.

The inhibition of GSK-3 has the chance to develop as a new method for cancer therapy because it could selectively induce apoptosis just in the malignant cells.



## Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
Zusammenfassung	
Abstract	
Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen	4
1. Einleitung	7
1.1 Glykogen Synthase Kinase-3	7
1.2 Inaktivierung der GSK-3 $\beta$ durch Serinphosphorylierung	9
1.3 Aktivierung der GSK-3 $\beta$ durch Tyrosinphosphorylierung	10
1.4 GSK-3 $\beta$ und seine Substrate	11
1.5 GSK-3 $\beta$ und seine Rolle im Wnt-Signalweg	12
1.6 Regulation von GSK-3 durch Insulin und Wachstumsfaktoren	13
1.7 GSK-3 und seine Inhibitoren	14
1.8 GSK-3 und das Tumorsuppressorprotein p53	16
1.9 GSK-3 und Zelltod	18
1.10 Aktivierungswege der Caspasekaskade	25
1.10.1 Aktivierung durch Todesrezeptoren	25
1.10.2 Mitochondriale Apoptose	27
1.10.3 Stressvermittelte Apoptose	29
1.10.4 Alternative Signalwege	29
1.11 Vernetzung der Signalwege	29
1.12 Kontrolle der Signalkaskaden	30
1.13 Kontrolle der nukleären Degradation	30
2. Zielsetzung	32
3. Material und Methoden	33
3.1 Material	33
3.1.1 Chemikalien	33
3.1.2 Geräte	34
3.1.3 Größenstandards, Kits und Matrices	34
3.1.4 Doppelsträngige siRNA, Oligonukleotide	34
3.1.5 Restriktionsenzyme und Puffer	35
3.1.6 Membranen, Filme und Plastikwaren	35
3.1.7 Glaswaren	35
3.1.8 Antikörper	35
3.2 Zellen und Zellkulturbedingungen	36
3.3 Methoden	38
3.3.1 Zellkultur und Transfektionsmethoden	38
3.3.1.1 Zellkultur	38
3.3.1.1.1 Passagieren von Zellen	38
3.3.1.1.2 Langzeit-Aufbewahrung und Anzucht von eukaryotischen Zellen	38
3.3.1.1.3 Bestimmung der Zellproliferation	39
3.3.1.1.4 Transfektion von siRNA mit Lipofectamine <sup>TM</sup> 2000	39

3.3.1.1.5	Behandlung von Zellen mit GSK-3-Inhibitoren	40
3.3.1.1.6	Behandlung der Zellen mit UV-C-Strahlung	40
3.3.1.1.7	Kolonie-Experiment	40
3.3.1.1.8	Bestimmung der Seneszenz: $\beta$ -Galaktosidase-Färbung	41
3.3.1.1.9	Vakuolenfärbung (MDC-Färbung)	41
3.3.1.1.10	DAPI-Färbung	41
3.3.1.1.11	MTT-Experiment	42
3.3.2	Protein-Methoden	42
3.3.2.1	Herstellung von Zelllysaten	42
3.3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)	42
3.3.2.3	Immunpräzipitation	43
3.3.2.3.1	Kopplung des Antikörpers an die Protein A-Sepharose	43
3.3.2.3.2	Immunpräzipitationsreaktion	43
3.3.2.3.3	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE	43
3.3.2.3.4	Westernblotting und immunochemische Detektion von Proteinen	44
3.3.2.3.5	Caspase-3/-9-Aktivitätsbestimmung	45
3.3.2.3.6	Präparation von Mitochondrien und mitochondrienfreier Zellextrakte zur Bestimmung der Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol	45
3.3.3	Nukleinsäure-Methoden	45
3.3.3.1	Isolierung apoptotischer DNS	45
3.3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	46
3.3.3.3	Isolierung der Gesamt-RNS-Menge	46
3.3.3.4	Umschreiben der RNS in cDNS	46
3.3.3.5	DNS-Extraktion aus dem Gel	47
3.3.4	FACS-Analyse	47
3.3.5	Rattenmodell	47
3.3.5.1	Plasmapräparation	48
3.3.5.2	Paraffineinbettung	48
3.3.5.3	Paraffinschnitte	48
3.3.5.4	Entparaffinierung	48
3.3.5.5	Histologische Färbung (PCNA- und TUNEL-Färbung)	49
4.	Ergebnisse	50
4.1	LiCl unterdrückt die Proliferation der Tumorzellen	50
4.2	LiCl-Behandlung induziert keine Seneszenz in Fibroblastenzellen	52
4.3	Nach Inhibition von GSK-3 mit LiCl wird keine Autophagie in Tumorzellen eingeleitet	53

4.4 Die Inhibition von GSK-3 löst Apoptose in HCT116-Tumorzellen aus	55
4.5 LiCl-induzierter Zelltod ist in HCT116-Zellen p53-unabhängig	61
4.6 LiCl löst Apoptose in HCT116-Kolonkarzinomzellen über den extrinsischen Weg aus und nicht über den intrinsischen Weg	63
4.7 LiCl induziert Apoptose in MT450-Mammakarzinomzellen (Ratte)	67
4.8 p53-Status der MT450-Zelllinie	69
4.9 Sequenzierung des Ratten- <i>p53</i> -Gens aus MT450-Zellen	70
4.10 LiCl induziert Apoptose in Tumoren von syngenem Ratten	71
4.11 GM38-Fibroblasten zeigen keinen Zellzyklusarrest nach LiCl-Behandlung	75
4.12 Die primären Zellen HDMEC und NHEK induzieren Apoptose nach LiCl-Behandlung	79
5. Diskussion	85
5.1 GSK-3-Inhibition und das Auslösen der Seneszenz	85
5.2 Inhibition der GSK-3 durch LiCl und das Einleiten des extrinsischen Apoptosesignals	86
5.3 p53-Unabhängigkeit der induzierten Apoptose nach GSK-3-Inhibition	88
5.4 LiCl und seine Wirkung im Rattenmodell	89
5.5 Einfluß von LiCl auf primäre Zellen	90
6. Ausblick	92
6.1 Isolierung des DISC-Komplexes	92
6.2 p53-unabhängige Apoptose und die Apoptoseinduktion des mutierten Ratten-p53 aus MT450-Zellen	93
6.3 Einfluß von LiCl auf andere primäre Zellen	93
7. Referenzen	94
Danksagung	102

## Abkürzungen

AIF	“Apoptosis Inducing Factor”
Alst.	Alsterpaullon
Apaf 1	“Apoptotic Protease Activating Factor 1”
ARF	“Alternative Reading Frame”
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	“Bcl-2-Antagonist of cell Death”
Bax	“Bcl-X Activated protein”
Bcl-2	“B-cell Lymphoma 2”
Bcl-X <sub>L</sub>	“Bcl-X long”
BDNF	“Brain-Derived Neurotrophic Factor”
BID	“Bcl-2 Interacting Domain Death agonist”
bp	Basenpaare
BSA	“Bovine Serum Albumine”
CAD	“Caspase-Activated Desoxyribonuclease“
CARD	“Caspase Recruitment Domain“
CdK	“Cyclin dependent Kinase”
CK1 $\alpha$	Kaseinkinase 1 $\alpha$
CMA	“Chaperone mediated autophagy”
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DAXX	“Death-associated protein X”
DD	“Death Domain”
DED	“Death Effector Domain”
DISC	“Death Inducing Signaling Complex”
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNS-PK	DNS-abhängige Proteinkinase
EDTA	Ethylendiamin,-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGF	“Epidermal Growth Factor”
eIF-2B	“Eukaryotic protein synthesis initiation factor-2B”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	“Fluorescent Activated Cell Sorting”
FADD	“Fas-Associated Death Domain”
FAP-1	“Fas-Associated Phosphatase-1”
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase-3
h	Stunde
HRP	“Horseradish Peroxidase”
IAP	“Inhibitor of Apoptosis”
IC50	Konzentration bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird
ICAD	“Inhibitor of CAD”
IGF-1	“Insulin-like Growth Factor”
IHC	“Immunhistochemistry”

IP	Immunpräzipitation
JNK	“Jun Nuclear Kinase”
Ki	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
LAMP-2A	“Lysosomal Associated-Membrane Protein 2A”
LEF/TCF	“Leukemia Enhancing Factor/T-cell Factor”
LiCl	Lithiumchlorid
MDC	Monodansylcadaverin
MDM2	“Mouse Double Minute 2”
mEq	Milli Äquivalenten
MMTV	“Mouse Mammary Tumor Virus”
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NGF	“Nerve Growth Factor”
NIDDM	“Non-Insulin-Dependent Diabetes mellitus”
NLS	“Nuclear Localization Signal”
NF-κB	Nuklearer Faktor-κB
p90RSK	“p90 Ribosomal S6 Kinase”
PBS	“Phosphate-Buffered Saline”
PCD	“Programmed Cell Death”
PCNA	“Proliferating Cell Nuclear Antigen”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B (Akt)
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethansulfonyl-Fluorid
PS	Phosphatidylserin
RIP1	“Receptor Interacting Protein Kinase 1”
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	“Rotations Per Minute”
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	“Small Interfering RNS”
tBID	“truncated Bid”
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRADD	“TNF-Receptor Associated Death Domain”
TRAF-2	“TNF-associated factor-2”
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUNEL	“Transferase-mediated dUTP biotin Nick-End Labeling”
UV	Ultraviolette Strahlung
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
XIAP	X-chromosomal gebundenen IAP



# 1. Einleitung

## 1.1 Glykogen Synthase Kinase-3

Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) wurde zuerst als eine von mehreren Serin/Threonin-Proteinkinasen entdeckt, welche die Glykogensynthese phosphorylieren, ein wichtiger regulatorischer Prozess in der Glykogenbiosynthese (Embi et al., 1980). Sie wurde aus der quergestreiften Muskulatur isoliert (Woodgett et al., 1984). In menschlichen Zellen gibt es zwei Isoformen von GSK-3 die von zwei separaten Genen kodiert werden, GSK-3 $\alpha$  mit einem Molekulargewicht von 51 kDa und GSK-3 $\beta$  das 47 kDa schwer ist. Die Gewichtsunterschiede sind die Folge einer glyzinreichen N-terminalen Domäne welche die GSK-3 $\alpha$  enthält.

Eine schematische Darstellung der zwei Isoformen ist in Abbildung 1 zu sehen:

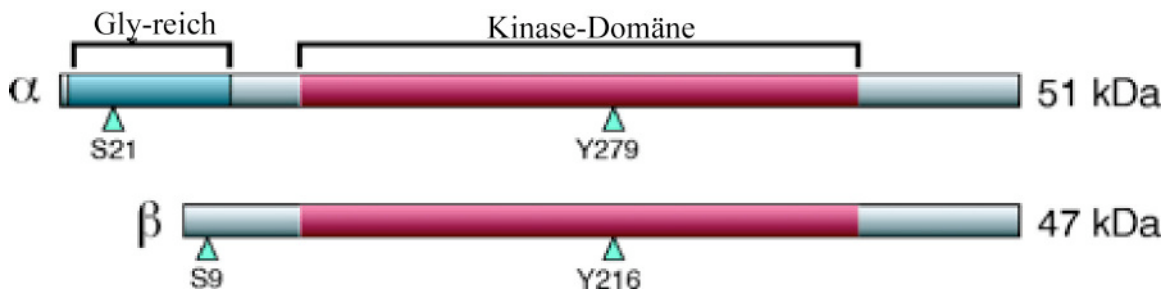


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zwei GSK-3 Isoformen GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ . Die Serin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen sind durch blaue Pfeile dargestellt. Die glyzinreiche N-terminale Domäne (Gly-reich), die nur bei GSK-3 $\alpha$  vorkommt, und die konservierte Kinasedomäne sind ebenfalls gekennzeichnet (Abbildung verändert aus Doble und Woodgett, 2003).

Beide Isoformen sind in Säugergeweben konstitutiv-aktiv, aber sie treten in hohen Konzentrationen nur im Gehirn auf (Woodgett, 1990, Woodgett, 1991). Sie zeigen außerdem eine 97 %-ige Ähnlichkeit in der Kinasedomäne, sind aber durch Unterschiede im C-Terminus charakterisiert und liegen auf zwei unterschiedlichen Chromosomen. Die GSK-3 wurde in Säugern entdeckt; Proteine mit markanten Sequenzhomologien wurden aber mittlerweile in allen Eukaryoten gefunden. Isoformen von Spezies die von der menschlichen weit entfernt sind, wie zum Beispiel die der Fliege (*Drosophila melanogaster*), zeigen mehr als 90 % Identität in der Sequenz der Kinasedomäne. Die GSK-3 Sequenz der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ist zu der menschlichen Form nur 60% identisch. Auch die Proteinfunktionen sind sehr gut in allen GSK-3-Homologen konserviert.

Trotz des hohen strukturellen Ähnlichkeitsgrades, sind die zwei Isoformen in ihrer Funktion nicht identisch. Dies wurde erst nach Deletion der GSK-3 $\beta$  in Mäusen sichtbar gemacht: Mäuse mit einer homozygotischen Deletion des Exon 2 der GSK-3 $\beta$  zeigen einen embryonal-lethalen Phänotyp; sie sterben zwischen Tag 13,5 und 14,5 der Embryonalentwicklung in Folge eines Leberschadens, der durch eine verstärkte Apoptoserate der Hepatozyten hervorgerufen wird (Yao et al., 2002). Eine Störung der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges ist der Auslöser dieser erhöhten Zelltodrate. NF- $\kappa$ B verhindert während der Embryonalentwicklung und die Leberregeneration die Apoptose in Hepatozyten.

Der GSK-3 $\alpha$  ist es nicht möglich den Phänotyp der GSK-3 $\beta$ -deletierten Mäuse zu retten, was darauf schließen lässt, dass die zwei GSK-3 Isoformen *in vivo* nicht redundant sind. Die GSK-3 $\beta$ -defizienten Mäuse können durch die Inhibition von TNF (Tumor Nekrose Faktor) gerettet werden.

In Vertebraten ist GSK-3 wichtig für die Festlegung der embryonalen Axen. Obwohl GSK-3 $\beta^{+/-}$ -männliche und -weibliche Tiere gesund und fruchtbar sind, haben sie keine lebensfähige GSK-3 $\beta^{-/-}$ -Nachkommen. Bis zum Tag 12,5 der Embryonalentwicklung zeigen die meisten GSK-3 $\beta^{-/-}$ -Tiere keine morphologischen Missbildung. Zwischen Emryonalstadium 13,5 und 14,5 sind die GSK-3 $\beta^{-/-}$ , im Vergleich zu den GSK-3 $\beta^{+/-}$ -Embryonen bleich, starr und lebensunfähig, siehe Abbildung 2. Die GSK-3 $\beta^{+/-}$ -Tiere haben eine gesunde Farbe und entwickeln sich normal. Im Falle der GSK-3 $\beta^{-/-}$ -Embryonen, konnten keine Anzeichen eines eingeschränkten Wnt-Signals, Cyklin D-Regulation,  $\beta$ -Catenin-Akkumulation oder Glykogenmetabolismus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Apoptose der Hepatozyten wahrscheinlich die ausschlaggebende Ursache des Todes der GSK-3 $\beta^{-/-}$ -Embryonen ist.

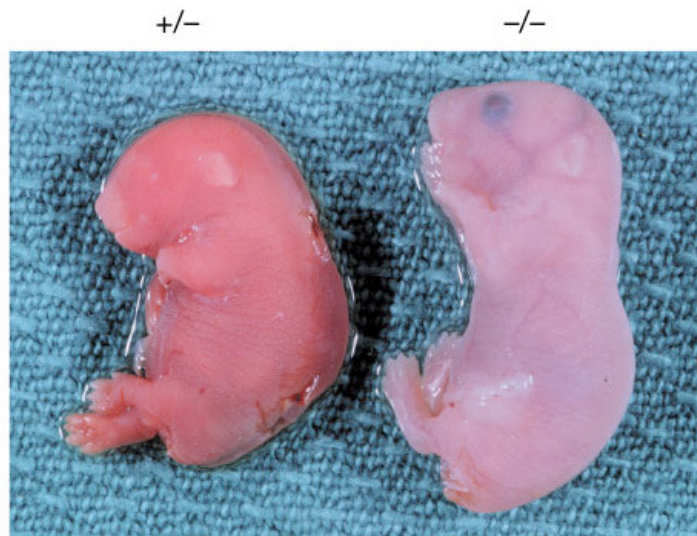


Abbildung 2: Phänotyp der GSK-3 $\beta^{-/-}$  und GSK-3 $\beta^{+/-}$ -Embryonen. GSK-3 $\beta^{-/-}$ -Embryonen am embryonalen Tag 14,5 sind lebensunfähig. (Abbildung aus Hoeflich et al., 2000).

Über einen Phänotyp der GSK-3 $\alpha$ -Mäuse mit einer Deletion der GSK-3 $\alpha$ -Isoform wurde noch nicht berichtet.

Neulich wurde eine Spleißvariante der GSK-3 $\beta$ -Isoform identifiziert (Mukai et al., 2002). Diese wurde GSK-3 $\beta$ 2 genannt und enthält eine 13-Aminosäureeinlage innerhalb der Kinasedomäne. Die Analyse der *in vitro* Kinaseaktivität von GSK-3 $\beta$ 2 hat, im Vergleich zu der ungespleißten Variante GSK-3 $\beta$ , eine verringerte Aktivität gegenüber dem Mikrotubuli-assoziierten Proteins tau gezeigt. GSK-3 $\beta$ 2 unterscheidet sich von der Urform auch hinsichtlich ihrer Lokalisation, weil sie hauptsächlich in dem Zellkörper der Nervenzellen lokalisiert ist.



Die GSK-3 spielt eine kritische und zentrale Rolle in vielen zellulären Signalwegen, wie zum Beispiel dem Insulin- oder dem Wnt-Signalweg. Die Kontrolle der GSK-3-Aktivität ist deshalb eine wichtige Komponente in der Regulation unterschiedlicher Funktionen, die vom Überleben der einzelner Zelle bis zur Wahrnehmung des gesamten Organismus reicht.

Eine Fehlsteuerung der GSK-3 $\beta$ -Aktivität führt zur Entstehung psychischer Erkrankungen, wie zum Beispiel der bipolaren affektiven Störung oder zu neurodegenerativen Störungen, wie der Alzheimerschen Krankheit. Die Verflechtung von GSK-3 mit verschiedenen pathophysiologischen Zuständen machte GSK-3 bereits in der Vergangenheit zu einem interessanten Zielprotein der Wirkstoffforschung. Deshalb entwickelte sich GSK-3 schon in den letzten Jahren immer mehr zu einem therapeutischen Zielmolekül.

Eine Eigenschaft der GSK-3 ist die Anforderung der Substraterkennung: Viele GSK-3 Substrate benötigen die Vorphosphorylierung von einer Primingkinase, die die Konsensussequenz S/T-X-X-X-(P)-S/T besitzt, bevor die Phosphorylierung durch die GSK-3 möglich ist. Die erste S/T (Serin/Threonin)-Gruppe stellt die Phosphorylierungsstelle für die GSK-3 dar und "X" steht für jede beliebige Aminosäure. Das C-terminale S/T (Serin/Threonin) wurde schon vorphosphoryliert (P). Ein Beispiel dafür ist die Phosphorylierung der Glykogen-Synthase durch GSK-3 $\beta$ . Die Glykogen-Synthase ist erst dann ein Substrat für GSK-3 $\beta$ , nachdem sie von Casein-Kinase-II innerhalb der Erkennungssequenz bereits vorphosphoryliert wurde. Diese primäre Phosphorylierung bildet eine Erkennungsstelle für GSK-3 $\beta$ , die anschließend vier Serine der Glykogen-Synthase phosphoryliert und so deren Aktivität hemmt (DePaoli-Rouch, 1984, Fiol et al., 1990, Rouch, 1990). Eine vorausgehende Phosphorylierung des Substrats innerhalb der Konsensussequenz erhöht die Aktivität von GSK-3 um das 100- bis 1000-fache, indem es die Bindung des Substrates an eine positiv geladene Tasche der Kinase fördert, die Orientierung der Kinase optimiert und das Substrat in die für die Phosphorylierung benötigte Position bringt. Negativ geladene Aminosäuren in der Nähe der vorphosphorylierten Stelle können den Phosphatrest jedoch ersetzen und so auch ohne "Priming" (Vorphosphorylierung) eine effiziente Phosphorylierung ermöglichen. GSK-3 $\beta$  steht unter dem Einfluß vieler regulatorischer Mechanismen, wobei ihre Phosphorylierung der am besten untersuchte Prozeß ist. Proteinkomplexbildung und intrazelluläre Lokalisierung haben aber auch essentielle regulatorische Einflüsse auf die GSK-3 $\beta$ -Aktivität.

## **1.2 Inaktivierung der GSK-3 $\beta$ durch Serinphosphorylierung**

Die Aktivität der GSK-3 $\beta$  kann durch Phosphorylierung an unterschiedlichen Serinstellen gehemmt werden (Plyte et al., 1992): Die Phosphorylierung des N-terminalen Endes der beiden GSK-3-Isoformen (Serin 9 bei GSK-3 $\beta$  und Serin 21 bei GSK-3 $\alpha$ ) inaktiviert die GSK-3. Es wurden mehrere Kinasen entdeckt, die diese Modifikation hervorrufen können, wie zum Beispiel p70 S6 Kinase, p90 Rsk (MAPKAP Kinase-1), Akt (Proteinkinase B) oder bestimmte Formen der Proteinkinase C. Die GSK-3-Inaktivierung führt zur Substratdephosphorylierung wie bei der Glykogen Synthase und eIF-2B (eukaryotic protein synthesis initiation factor-2B), das als Folge eine erhöhte Glykogen-

und Proteinsynthese hat (Cohen et al., 1997). Diese Interaktionen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die Wirkung der inaktivierten GSK-3 $\beta$  das an Serin 9 phosphoryliert wurde ist ein kritischer Faktor in vielen Rezeptor-gebundenen Signalprozesse in, in der anti-apoptotischen Wirkung des Akt-Signalweges und in bestimmten Krankheiten.

Inhibition von GSK-3 kann durch Protein Phosphatase 2 reaktiviert werden. Auch eine Insulinbehandlung inaktiviert GSK-3 $\beta$ , ein Effekt, der mit der Phosphorylierung der Serin 9-Stelle assoziiert ist.

Die Akt-Kinase wurde als die wichtigste Kinase in der Insulinantwort identifiziert.

Stressfaktoren wie Hitzeschock oder oxidativer Stress können auch die GSK-3 $\beta$ -Aktivität regulieren; manche Studien haben gezeigt, dass ein Hitzeschock Akt aktivieren kann. Die Akt-Aktivierung wurde also mit der GSK-3 $\beta$ -Inhibition in Verbindung gesetzt.

Diese Untersuchungen zeigten, dass es mehrere Mechanismen gibt, welche die Inhibition von GSK-3 $\beta$  über die Phosphorylierung der Serin 9-Stelle regulieren.

### 1.3 Aktivierung der GSK-3 $\beta$ durch Tyrosinphosphorylierung

Im Gegensatz zur Inhibition von GSK-3 $\beta$  über die Serin-Phosphorylierung erhöht die Phosphorylierung am Tyrosin 216 die Enzymaktivität. In der Arbeit von Hughes (1993) konnte gezeigt werden, dass GSK-3 $\beta$  *in vivo* an der Tyrosinstelle 216 phosphoryliert ist und dass ihre Aktivität von der Phosphorylierung an dieser Stelle abhängig ist.

Die Tyrosinkinase ZAK1 erhöht die GSK-3 $\beta$ -Aktivität durch ihre direkte Phosphorylierung. Gleichzeitig kann Fyn, ein Mitglied der src-Tyrosinkinasefamilie, GSK-3 direkt an Tyrosin 216 phosphorylieren. Weiterhin kann GSK-3 über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration an derselben Position phosphoryliert werden (siehe Abbildung 3).

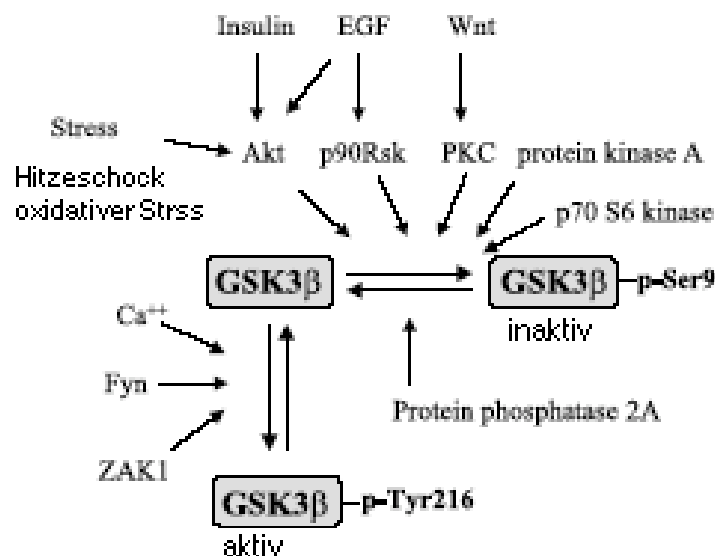


Abbildung 3: Phosphorylierungs-abhängige Regulation von GSK-3 $\beta$ . Phosphorylierung an Serin 9 der

GSK-3 $\beta$  hemmt ihre Aktivität. Einige Kinasen die GSK-3 an Serin 9 phosphorylieren und die entsprechenden Stimuli, welche die Kinasen aktivieren, sind dargestellt. Die Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  an Tyrosin 216 durch die Kinasen ZAK1 oder fyn oder durch erhöhte Kalziumkonzentration führt zu ihrer Aktivierung (Abbildung aus Grimes et al., 2001).

EGF: epidermal growth factor; IGF-1: Insulin-like growth factor-1; NGF: nerve growth factor.

### 1.4 GSK-3 $\beta$ und seine Substrate

GSK-3 $\beta$  phosphoryliert eine Reihe unterschiedlicher Gruppen von Substraten. Aber nur wenige wurden so im Detail analysiert, dass ihre Phosphoylierungsstellen bekannt sind. Das metabolische Enzym Glykogen-Synthase, das auch der Namensgeber der GSK-3 Kinase wurde, war das erste beschriebene Substrat.

Eine Liste der Säugetierproteine, die durch GSK-3 $\beta$  phosphoryliert werden, ist in Tabelle 1 vorgestellt:

Metabolische und Signalproteine	Strukturproteine	Transkriptionsfaktoren
ActeylCoA Carboxylase Amyloid Prekursorprotein APC  ATP-Citrat Lyase Axin cAMP-abhängige Proteinkinase Zyklin D1 eIF2B Glykogen Synthase Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) Myelin Basic Protein NGF-Rezeptor Protein Phosphatase 1 Protein Phosphatase Inhibitor-2 Pyruvat Dehydrogenase	MAP1B MAP2 Neurales Zell- adhäsionsprotein (NCAM) Tau	AP-1 $\beta$ -Catenin C/EBP $\alpha$  CREB Glukokorticoidrezeptor HSF-1 Myc NFAT NF $\kappa$ B

Tabelle 1: Säugetierproteine, welche durch GSK-3 $\beta$  phosphoryliert werden (modifiziert aus Grimes et al., 2001).

## 1.5 GSK-3 $\beta$ und seine Rolle im Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist eine wichtige Komponente während der Embryonalentwicklung und bestimmt über die Entwicklung von Stammzellen im adulten Organismus (Seidensticker und Behrens, 2000).

Der Wnt-Signalweg ist einer von vielen Signaltransduktionswegen, durch die Zellen auf äußere Signale reagieren können. Der Signalweg ist nach seinem Liganden "Wnt" benannt, ein Signalprotein, das als lokaler Mediator eine wichtige Funktion bei der Entwicklung verschiedener tierischer Zellen einnimmt. "Wnt" setzt sich zusammen aus *Wg* für *Wingless* und *Int-1*. Die Bezeichnung *Wingless* stammt aus Beobachtungen mit der Fliege *Drosophila melanogaster*, in der Mutationen im *wingless*-Gen zu einer flügellosen Variante der Fliege führen. Das *Int*-Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn seine Expression durch die Integration eines des MMT-Viren ("mouse mammary tumor virus") in der Nähe des *int1*-Gens (heute *Wnt-1*) aktiviert wird. Wnt gehört zu einer Familie von Glykoproteinen, die eine Reihe von membrangebundenen Rezeptoren wie zum Beispiel Frizzled aktivieren.

Der kanonische Wnt-Signalweg ist hoch konserviert (Hart et al., 1998, Peifer et al., 2000). In Vertebraten spielt GSK-3 $\beta$  eine sehr wichtige Rolle im Wnt-Signalweg. Für eine effiziente Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin ist die Bildung eines Multiproteinkomplexes notwendig, das aus Axin, APC (Adenomatous polyposis coli), CK1 $\alpha$  und GSK-3 besteht (Ikeda et al., 1998, Itoh et al., 1998, Behrens et al., 1998, Kishida et al., 1998, Hart et al., 1998). In Abwesenheit eines Signals befindet sich die aktive GSK-3 $\beta$  in einem Multiproteinkomplex, der dem Abbau von  $\beta$ -Catenin durch Ubiquitinierung verhilft.

$\beta$ -Catenin wird von CK1 $\alpha$  an Serin S45 vorphosphoryliert (Liu et al., 2002). Anschließend wird  $\beta$ -Catenin durch GSK-3 $\beta$  an den Serinen S41, S37 und S33 des N-Terminus phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wird in Anwesenheit von Axin verstärkt. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird von dem F-Box-Protein  $\beta$ TrCP, einer Komponente einer E3-Ubiquitinligase, polyubiquitiniert und anschließend im 26S-Proteasom abgebaut.

Axin und APC sind weitere Substrate von GSK-3 $\beta$ . Die Phosphorylierung von Axin durch GSK-3 $\beta$  stabilisiert das Protein, und die Phosphorylierung von APC fördert die Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und APC.

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors Frizzled aktiviert die Wnt-Signalkaskade und führt zur Inaktivierung von GSK-3 $\beta$ . Dadurch wird die Degradation von  $\beta$ -Catenin gestoppt, was zu einer erhöhten zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin-Konzentration führt beziehungsweise zur Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Durch Assoziation mit dem TCF/LEF-Protein ("T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor-1") werden die Wnt-Zielgene aktiviert (Behrens et al., 1996, Dale 1998).

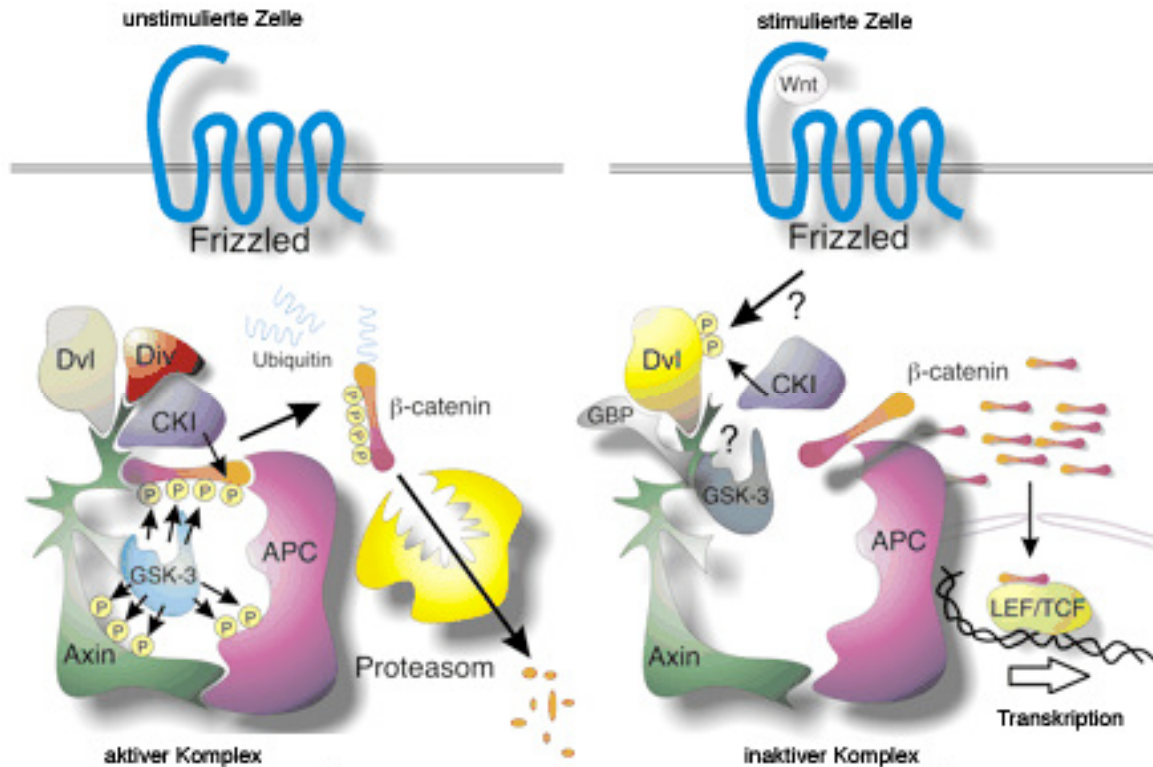


Abbildung 4: Rolle der GSK-3 im Wnt-Signalweg. In unstimulierten Zellen phosphoryliert CK1 β-Catenin an Serin S45 vor, das anschließend durch GSK-3 an S41, S37 und S33 phosphoryliert wird. β-Catenin wird daraufhin ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut. Das Ankyrinprotein Diversin (Div) hilft CK1 zum Multiproteinkomplex zu kommen. Die Wnt-Stimulation aktiviert den Frizzled-Rezeptor und über Dishevelled (Dvl) wird die Phosphorylierung von β-Catenin gehemmt. Die Menge an dephosphoryliertem β-Catenin nimmt zu und wird in den Zellkern transportiert, wo es Gene aktiviert die unter der Kontrolle der TCF/LEF Transkriptionsfaktoren stehen (Abbildung modifiziert aus Doble und Woodgett, 2003).

### 1.6 Regulation von GSK-3 durch Insulin und Wachstumsfaktoren

GSK-3 wurde zuerst als negativer Regulator der Glykogen-Synthese identifiziert. Insulin verhindert die Phosphorylierung und Aktivierung der Glykogen-Synthase an den Stellen, an denen sie von der GSK-3 phosphoryliert wurde (Parker et al., 1983). Heute ist bekannt, dass die Proteinkinase B (PKB oder Akt) die Phosphorylierung der N-terminalen Serine katalysiert. Als Antwort auf den Insulinstimulus fördert die Inhibition von GSK-3 die Phosphorylierung und die Aktivierung der Glykogen-Synthase, um so die Glykogensynthese anzukurbeln (siehe Abbildung 5).

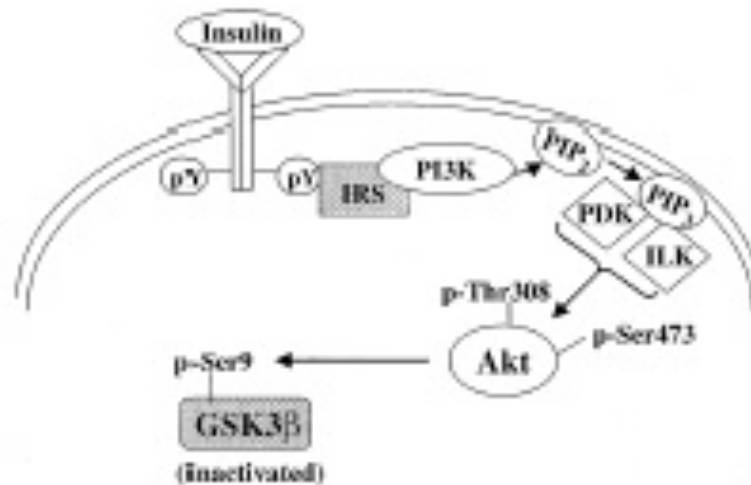


Abbildung 5 : Schema des Signalweges, der die Insulin-induzierte Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  reguliert. Durch Insulin wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche die Akt-induzierte Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  hervorruft. IRS: Insulin Rezeptorsubstrat; ILK: "Integrin-linked kinase"; PDK: "Phosphoinositide-dependent kinase"; PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PIP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (Abbildung aus Grimes et al., 2001).

GSK-3 phosphoryliert und inhibiert dadurch das eIF2B Protein (eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B) und hemmt somit die Proteinsynthese. Die GSK-3-Inaktivierung führt deshalb zu einer erhöhten Proteinsyntheserate (Welsh und Proud, 1993, Welsh et al., 1998).

### 1.7 GSK-3 und seine Inhibitoren

Es wurde nachgewiesen, dass eine fehlerhafte Regulation der GSK-3 einen Einfluß auf die Entwicklung unterschiedlicher Krankheiten hat, wie zum Beispiel Alzheimer, bipolare affektive Störungen, nicht-insulinpflichtige Diabetes (NIDDM = "noninsulin-dependent diabetes mellitus") und Krebs. Als Folge arbeitete man daran GSK-3-Inhibitoren zu entwickeln. Es wurden vier Regionen im GSK-3-Molekül gefunden, an die ein Inhibitor binden kann: Die Mg<sup>2+</sup>/ATP-Bindedomäne, eine zweite (Mg<sup>2+</sup>)-Bindedomäne, die Substratbindetasche und die GSK-3 Gerüstbinderegion. Ein Überblick der GSK-3-Inhibitoren ist in Tabelle 2 dargestellt:

Inhibitor	Inhibitionskraft	Inhibitionsweg
<b>Lithium</b>	Ki = 2 mM	Mg-Konkurrent
<b>Paullone (Alsterpaullon)</b>	IC <sub>50</sub> = 4-80 nM	ATP-Konkurrent
Beryllium	IC <sub>50</sub> = 6 $\mu$ M	Mg- und ATP-Konkurrent
bivalentes Zink	IC <sub>50</sub> = 15 $\mu$ M	unbekannt
Aldisinalkaloide	IC <sub>50</sub> = 10 nM	ATP-Konkurrent

Aloisine	IC <sub>50</sub> = 0,4-85 µM	ATP-Konkurrent
Anilinomaleimide	K <sub>i</sub> = 10-30 nM	ATP-Konkurrent
Arylpyrazolopyridazine	IC <sub>50</sub> = 0,8-150 nM	ATP-Konkurrent
Bisindolmaleimide	IC <sub>50</sub> = 5-170 nM	ATP-Konkurrent
Halomethylarylketone	IC <sub>50</sub> = 0,5 - 75 µM	unbekannt
Indirubine	IC <sub>50</sub> = 5-50 nM	ATP-Konkurrent
Pseudosubstratpeptide	K <sub>i</sub> = 0,7 mM	Substrat-Konkurrent

Tabelle 2: GSK-3 Inhibitoren. IC<sub>50</sub> steht für die mittlere inhibitorische Konzentration bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird. K<sub>i</sub> ist die Dissoziationskonstante des Inhibitors (modifiziert aus Forde und Dale, 2007).

Bereits in den 90er Jahren wurde Lithium als potentieller GSK-3β-Inhibitor entdeckt (Klein et al., 1996). Er wird schon seit Jahren in der Behandlung von manisch-depressiven Erkrankungen erfolgreich eingesetzt und auch für die Krebstherapie ist die Weiterentwicklung der GSK-3β Inhibitoren wichtig.

Auch wenn Lithium auch die Aktivität anderer Enzyme, wie zum Beispiel der Inositolphosphatase hemmt, so ist die GSK-3β eine der empfindlichsten Kinasen, die auf Lithium reagiert (Stambolic et al., 1996).

Die Entdeckung, dass Lithium GSK-3 inhibieren kann, basiert auf einer Feststellung von Klein (1996). Er hatte beobachtet, dass die Dorsalisierung, die durch Lithiumbehandlung erreicht wurde, der ektopischen Expression der *wnt*-Gene in *Xenopus*-Embryonen ähnlich war. Weitere Experimente zeigten, dass Lithium GSK-3 mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) von 2 mM direkt inhibiert (Klein et al., 1996). Bemerkenswert ist, dass die GSK-3-Inhibition durch Lithium bei Konzentrationen stattfindet, die bereits bei manisch-depressiven Erkrankungen eingesetzt wird.

Somit wird die GSK-3-Aktivität im Falle einer Therapie mit einer Lithiumkonzentration von 1 mM abgedämpft aber nicht komplett inhibiert. Das ist auch die logische Wirkung von Psychopharmaka: sie vermindern die Stärke des Signals ohne wichtige Signalmechanismen zu blocken (Jope, 1999).

Lithium inhibiert ferner die GSK-3β-abhängige Phosphorylierung des tau-Proteins. Außerdem wurde gezeigt, dass Lithium keinen Einfluss auf weitere Proteinkinasen hat. Lithium besitzt die Fähigkeit beide GSK-3-Isoformen zu inhibieren.

2001 war es Ryves möglich zu zeigen, dass Lithium durch Konkurrenz mit dem Magnesium-Ion GSK-3β hemmen kann. Diese Art von Inhibition findet man in allen GSK-3-Isoformen in Säugetierzellen und *Dictyostelium* und ist bei keinen weiteren Metallionen der Gruppe I zu finden. Entsprechend ist die Wirksamkeit von Lithium von der Magnesiumkonzentration abhängig.

In großen Mengen verabreicht hat Lithium Nebenwirkungen wie Bewusstlosigkeit oder sogar Tod. GSK-3β wird außerdem mit Alzheimer in Verbindung gebracht und spielt auch für die Organisation des Zytoskeletts von Neuronen eine wichtige Rolle. Eine abnormale GSK-3-Aktivität führt also zu einer Veränderung der Neurophysiologie des Gehirns und kann deswegen Auslöser für affektive Geistesstörungen sein.

## 1.8 GSK-3 und das Tumorsuppressorprotein p53

1979 wurde erstmals das Protein p53 in SV40-transformierten Zellen beschrieben. Die Fähigkeit von p53 überflüssige, beschädigte oder infizierte Zellen durch Apoptose zu entfernen ist für die einwandfreie Regulation der Zellproliferation in Mehrzellorganismen notwendig (Kerr et al., 1972, Huang und Strasser, 2000). Die Tatsache, dass p53 in über 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert und somit nicht mehr funktionsfähig ist, unterstreicht dessen zentrale Rolle als Tumorsuppressorprotein. In den meisten der übrigen Fälle ist die p53-Aktivität durch alternative Mechanismen beeinträchtigt (Vogelstein et al., 2000), wie zum Beispiel durch eine erhöhte Konzentration des negativen Regulators Mdm2 oder Mdm2-Regulatoren, wie zum Beispiel ARF (Vogelstein et al., 2000, Vogt Sionov et al., 2001). Meist besteht die Mutation von *p53* nur im Austausch eines einzigen Basenpaares. Hierdurch verliert *p53* seine eigentliche Funktion und gewinnt zum Teil die Funktion eines Onkogens, welches seinerseits zur Tumorgenese beiträgt (Dittmer et al., 1993, Vousden, 2000). p53 unterliegt einem negativen Rückkopplungsmechanismus mit dem von ihm regulierten Mdm2-Protein: Das Mdm2-Protein bindet an die Transaktivierungsdomäne des p53-Proteins und verhindert so seine Assoziation mit basalen Transkriptionsfaktoren. In gesunden Zellen ist die p53-Konzentration niedrig gehalten (siehe Abbildung 6). Dieser Rückkopplungsmechanismus, durch den das Mdm2-Protein die Menge von p53 reguliert, funktioniert bei mutiertem p53 nicht mehr und es kommt zur erhöhten p53-Konzentration in den Zellen.

Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von p53 kann zwei verschiedene Auswirkungen haben:

- 1) Zellzyklusarrest, wobei die betroffenen Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert werden: Durch Wachstumsstop wird der Verlauf des Zellzyklus angehalten, so dass die beschädigte DNS nicht repliziert wird. Während des Wachstumsarrests, kann p53 für die DNS-Reparatur wichtige Proteine aktivieren.
- 2) Induktion von Apoptose durch Transkriptions-abhängige oder -unabhängige Signalwege (Burns, El-Deiry 1999, Gottlieb, Oren, 1998, Levine, 1997, Vousden und Lu, 2002): Die Apoptose ist die letzte Möglichkeit, um die Proliferation der Zellen, die eine abnormale DNS enthalten, zu verhindern. Die zelluläre p53-Konzentration wird rigoros unter Kontrolle gehalten. Mdm2 kann durch seine Bindung die Degradation von p53 durch das Ubiquitinierungssystem hervorrufen. Unterschiedliche Arbeiten haben bis jetzt eine Rolle von GSK-3 $\beta$  in der Regulation der p53-Funktion in menschlichen Kolonkarzinom- und Osteosarkomzellen gezeigt (Ghosh und Altieri, 2005, Tan et al., 2005, Kulikov et al., 2005). Das aktivierte p53 führt zur Expression unterschiedlicher Zielgene, unter anderem auch *p21<sup>waf1/cip1</sup>*, *MDM2*, *Bax* u.s.w...



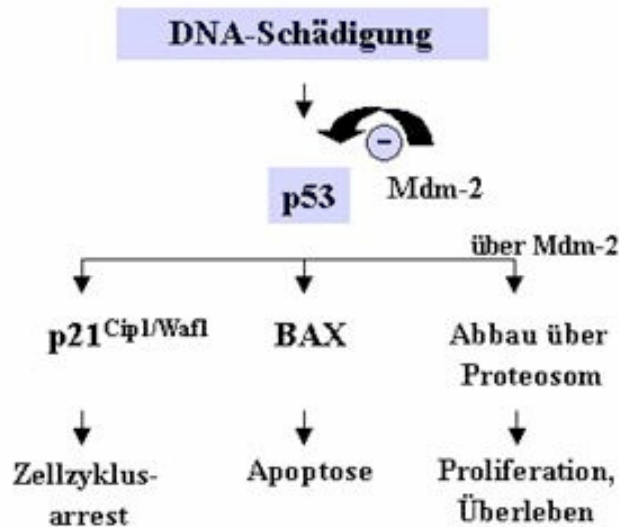


Abbildung 6: Aktivierung und Funktion von p53 und Mdm2, sein negativen Regulator. In proliferierenden Zellen wird die Konzentration an p53, durch seinen Abbau über das 26S-Proteasom niedrig gehalten. Durch Schädigung der DNS steigt aber die Menge des p53-Proteins stark an, das als Folge die Aktivierung unterschiedlicher Gene hat, die zum Zellzyklusarrest beziehungsweise Apoptose führen (*p21<sup>Cip1/Waf1</sup>* oder *Bax*). Bild von [www.edoc.hu-berlin.de](http://www.edoc.hu-berlin.de).

In den letzten Jahren wurden viele apoptotische Stimuli gefunden, die die Anreicherung von GSK-3 $\beta$  im Zellkern, wo es mit p53 kolokalisiert, unterstützen. Die Inhibition von GSK-3 $\beta$  durch 20 mM LiCl hat die Assoziation zwischen p53 und GSK-3 $\beta$  verstärkt. Diesen Effekt konnte man durch eine direkte Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  auf p53 erklären oder über einen indirekten Weg, wobei GSK-3 $\beta$  ein anderes Protein phosphoryliert das mit p53 oder GSK-3 $\beta$  interagiert (Watcharasit et al., 2003).

Eine effiziente Degradation wiederum des p53-Proteins erfordert die Phosphorylierung mehrerer Serine im zentralen Bereich des Mdm2-Proteins (Blattner et al., 2002):

Kulikov konnte 2005 zeigen, dass GSK-3 das p53-Protein reguliert, indem es wichtige Stellen phosphoryliert, die im zentralen Bereich des Mdm2-Proteins liegen.

Ein Schaubild, das die Regulation von p53 durch Mdm2 zeigt ist in Abbildung 7 zu sehen.

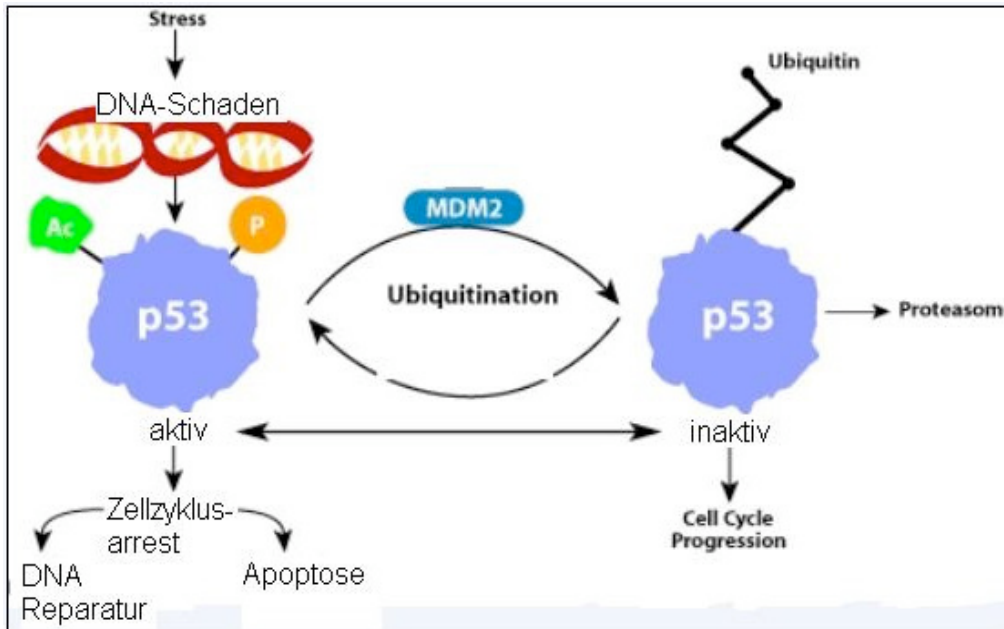


Abbildung 7: Regulation von p53 durch Mdm2. Stress löst einen DNS-Schaden aus, der als Folge eine erhöhte p53-Menge hat. Es kommt zum Zellzyklusarrest. In diesem Zeitfenster kann der Schaden entweder repariert werden oder falls der Schaden zu groß ist kommt es zur Apoptose. In gesunden Zellen wird die p53-Konzentration über Mdm2 niedrig gehalten. Mdm2 ubiquitiniert p53 und markiert es dadurch für den Abbau durch das Proteasom (Bild von [www.emdbioscience.com](http://www.emdbioscience.com)).

GSK-3 $\beta$  kann aber nicht nur das Mdm2-Protein phosphorylieren, sondern auch direkt p53: *In vitro* wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von p53 an Serin 37 durch die DNS-PK und die Phosphorylierung an Serin 33 durch GSK-3 $\beta$  ermöglicht wird (Turenne und Price, 2001). GSK-3 $\alpha$  konnte unter keinen Bedingungen p53 phosphorylieren.

## 1.9 GSK-3 und Zelltod

Zelltod kann auf verschiedene zelluläre Prozesse zurückzuführen sein. Man unterscheidet dabei Zelltod durch:

- ❖ Autophagie
- ❖ Nekrose
- ❖ Apoptose

Autophagie ist eine Zellfunktion bei der eigene Bestandteile einer Zelle abgebaut werden. Der Prozess selbst ist notwendig für ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau neuer beziehungsweise alter Zellbestandteile. Autophagozytose ermöglicht auch den Abbau von Viren, Bakterien und Fremdeiweißen, die sich in der Zelle anhäufen; sie dient damit auch der Immunantwort.

Es gibt zwei Signale, die diesen Prozess auslösen: Ein Mangel an Nährstoffen führt zum Abbau von nicht-essentiellen Zellbestandteilen. Damit werden überlebenswichtige Prozesse weiterhin mit Energie versorgt. Ein Überangebot von Nährstoffen hingegen

kann auch Autophagozytose auslösen, dabei werden durch den Energieüberschuss neue Organellen gebildet und alte wiederverwendet. Man teilt den Prozess der Autophagie in drei Gruppen auf: Makroautophagozytose, Mikroautophagozytose und Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA = "chaperone mediated autophagy").

Bei der Makroautophagozytose schließt eine Membran, die für den Abbau markierten Strukturen ein. Danach vereinigt sich diese mit einem Lysosom. In der Mikroautophagozytose umschließt ein Lysosom direkt die abzubauenen Strukturen ein. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden Proteine von Hsp70-Chaperonen erkannt und zum Lysosom geführt, wo sie durch LAMP-2A ("lysosomal membrane-associated protein 2A") ins Lysosom gelangen und abgebaut werden. Autophagozytose ist ein Prozess, der bei vielen Eukaryonten, wie Pflanzen, vielzelligen Tieren, Schleimpilzen und Hefen auftritt.

Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse, zum Beispiel durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanische Verletzungen zugrunde. Diese oben genannten Faktoren führen in größeren Bereichen des Gewebes zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Die Folge ist das Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran. Dadurch werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt, die Fresszellen anlocken und damit eine Entzündungsreaktion hervorrufen (siehe Abbildung 8).

Obwohl Apoptose und Nekrose als zwei unterschiedliche Formen des Zelltods betrachtet werden, gibt es Hinweise, daß Apoptose und Nekrose nur zwei einer Reihe von möglichen morphologisch und biochemisch unterscheidbaren Formen des Zelltods sind (Ankarcrona et al., 1995, Leist und Nicotera, 1997). Ein nekrotischer Zelltod kann beispielsweise einem apoptotischen Zelltod folgen (sekundäre Nekrose), wenn die apoptotischen Zellen nicht durch Phagozyten aufgenommen werden (Leist et al., 1995, Leist und Nicotera, 1997). Der apoptotische und der nekrotische Zelltod können *in vivo* durch die Auswirkungen des Zelltods auf das umliegende Gewebe unterschieden werden. Im Gegensatz zu den Folgen einer Nekrose löst eine Apoptose, aufgrund einer raschen phagozytotischen Entfernung apoptotischer Zellen aus dem Gewebe, keine inflammatorische Antwort aus (Savill et al., 1993, Leist und Nicotera, 1997).

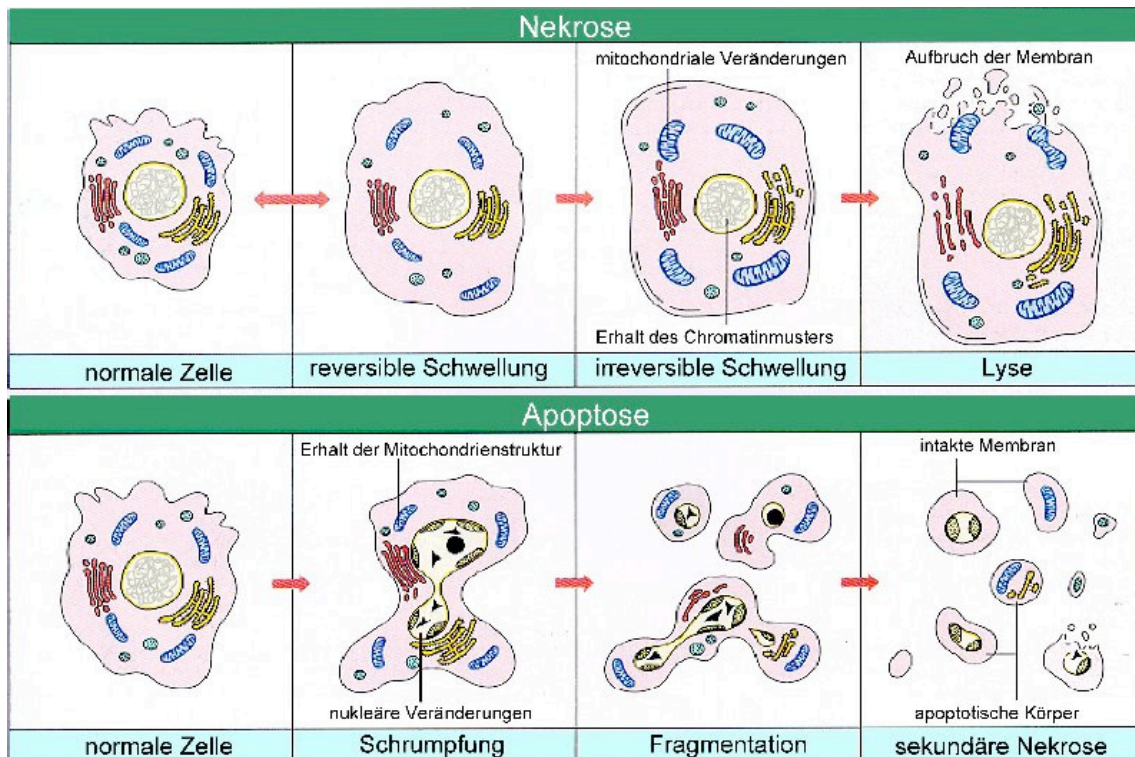


Abbildung 8: Übersicht des Verlaufs von Nekrose und Apoptose.

Der apoptotische Zelltod ist durch definierte Veränderungen der Zelle charakterisiert, wie zum Beispiel: Schrumpfung der Zelle, Bläschenbildung der Membran, Kondensation des Chromatins, Fragmentierung des Zellkerns und Zerfall der Zelle in vesikuläre Strukturen, so genannte apoptotische Körper.

Der nekrotische Zelltod ist durch andere morphologische Veränderungen der Zelle beschrieben. Durch Schädigung der Plasmamembran nekrotischer Zellen, strömt Wasser in die Zelle ein. Die Zelle schwillt an und lysiert letztendlich. Durch die Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteile verursacht ein nekrotischer Zelltod eine entzündliche Reaktion im Gewebe (Abbildung aus Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keeseey, 1995).

Der programmierte Zelltod (PCD) ist ein für die Entwicklung (Entfernen der Häute zwischen Zähnen und Fingern oder bei der Metamorphose der Kaulquappe zum Frosch) und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus lebenswichtiger Mechanismus. Nur wenn Neubildung und Eliminierung von Zellen im Gleichgewicht steht, bleibt der Organismus gesund. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, sind krankhafte Erscheinungen wie Krebs die Folge. Der als Apoptose (*apo* = ab, weg, los; *ptosis* = Senkung; stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst) benannte, universell in nahezu allen Körperzellen ausführbare, programmierte Zelltod ist durch charakteristische Veränderungen der betreffenden Zelle und nachfolgende Phagozytose im Zellverband gekennzeichnet. Darüber hinaus nimmt die Apoptose eine zentrale Stellung bei der Regulation des Immunsystems ein und wirkt zum Beispiel durch Eliminierung autoreaktiver sowie nicht mehr benötigter aktivierter T-Zellen Autoimmunerkrankungen entgegen. Außerdem werden entartete oder mit Viren infizierte Zellen durch Apoptose beseitigt und so großer Schaden, wie zum Beispiel eine Tumorbildung verhindert.

Je nach Zelltyp und Auslöser kann die Apoptose auf drei verschiedenen Signalwegen eingeleitet werden. Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen, Apoptose-auslösenden Wege ist die Initiierung einer Caspase-Kaskade, die ihrerseits unumkehrbar den Zelltod einleitet.

- ❖ Typ-I-Weg: Bei diesem Weg (extrinsisch) werden Zellmembranrezeptoren (Todesrezeptoren) aktiviert. Die Bindung von Liganden wie Apo, Fas oder TNF an ihre jeweiligen Rezeptoren führt über einen Komplex zur Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 und -10 (Abbildung 9).
- ❖ Typ-II-Weg: Bei diesem Weg (intrinsisch) spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle. Cytochrom c (bekannt als Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium) ist der auslösende Faktor. Bei der Aktivierung dieses Apoptosewegs öffnen sich Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran und setzen Cytochrom c ins Zytoplasma frei. Im Zytoplasma bilden Cytochrom c, Apaf-1 (“apoptotic protease activating factor“) und die Pro-Caspase-9 das Apoptosom, wodurch zusammen mit ATP Caspase-9 aktiviert wird (Abbildung 9).
- ❖ Kürzlich wurde ein dritter durch Stress ausgelöster Signalweg entdeckt. Dabei wird Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und Caspase-12 aktiviert.

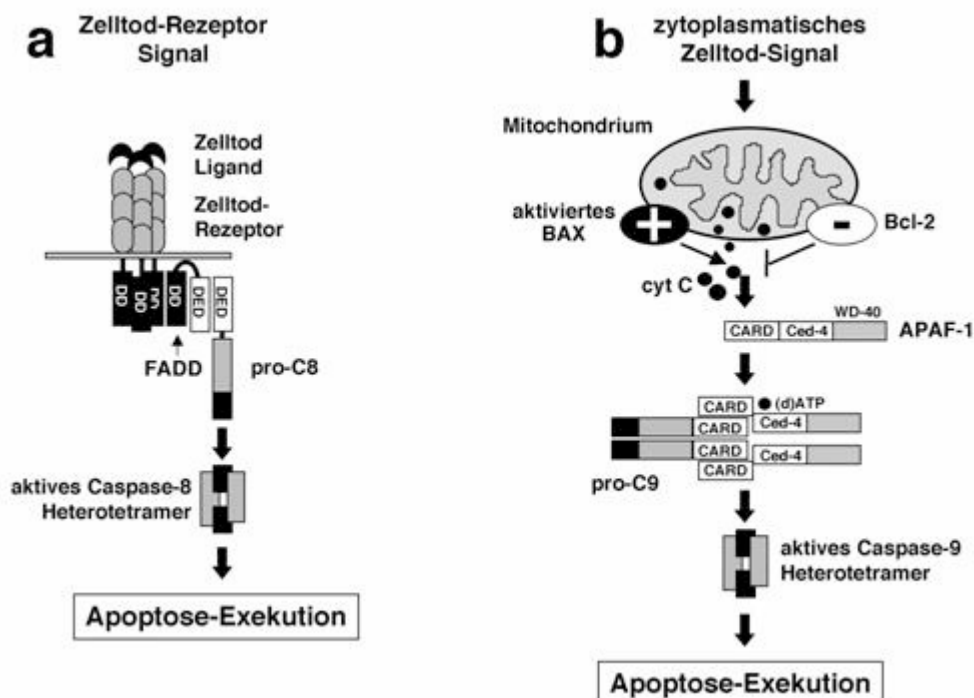


Abbildung 9: Aktivierung des Todesrezeptor-vermittelten und des mitochondrialen Apoptose-Signalweges  
**A:** Aktivierung von Todes-Rezeptoren führt zur Bildung eines DISC (“Death-Inducing Signaling Complex”). Im Fall des CD95/Fas-Rezeptors führt die Bindung des trimeren Fas-Liganden an ein Rezeptor-Trimer zur DISC-Bildung. Das FADD-Adapterprotein (“Fas-associated death domain“) wird über die eigene und die Todes-Domänen (DD) in CD95

rekrutiert. Dies stimuliert die Bindung von Procaspase-8 (C8) über die Death-Effektor Domäne (DED), wodurch ihre Aktivierung zur aktiven Caspase-8 induziert wird.

**B:** Der mitochondriale Apoptose-Signalweg kann über die Aktivierung von p53, zum Beispiel nach DNS-Schädigung, aktiviert werden. Über Bax ("Bcl-X activated protein") wird die Freisetzung von Cytochrom c induziert. Dies führt zur Aktivierung des APAF-Adapterproteins ("apoptotic protease activating factor 1"), wodurch die Rekrutierung von Procaspase-9 in den Komplex ausgelöst wird. Procaspase-9 wird autokatalytisch aktiviert und die Effektorcaspase-Signalkaskade aktiviert (Abbildung aus der Dissertation von Dilek Güner, HU Berlin).

Der PCD wird morphologisch durch Kondensation und Fragmentierung des Chromatins, Schrumpfung zellulärer Organellen und der Abrundung der Zellmembran sichtbar. Die in Apoptose befindliche Zelle wird als solche von Nachbarzellen erkannt, welche die residuellen Bestandteile phagozytieren. Eine Entzündungsreaktion bleibt dabei aus (Wyllie et al., 1980).

Apoptose kann durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden. So können z.B. Chemikalien oder Strahlung Apoptose induzieren. Auch ein Entzug von Überlebens- oder Wachstumsfaktoren und Zytokinen kann Apoptose verursachen.

In der Zelle werden durch die obengenannten Stimuli die Caspasen (Cysteinyln Asparat-spezifische Proteasen) aktiviert. Diese für die Apoptose bedeutsame Proteinfamilie wurde Anfang der 90er Jahre beschrieben (Miura et al., 1993) und stellt den zentralen Teil der Apoptose-Maschinerie dar (Lamkanfi et al., 2002). Obwohl die Mehrheit dieser Proteasen im Zytoplasma lokalisiert ist, finden sich solche Enzyme auch an der Kernmembran, im Kern, am Golgi-Apparat (Caspase-12) oder an den Mitochondrien (Caspase-9, -3 und -2). Diese Selektivität der Aktivierungskaskade ergibt sich infolge der spezifischen Peptidmotive, die alle Enzyme erkennen. Fällt in der Kaskade eine Caspase aus, kann eine andere ersetzend eingreifen (Zheng et al., 2000).

Die Weitergabe des Signals durch bereits aktivierte Caspasen kann durch Aktivatoren und Inhibitoren moduliert, beschleunigt oder angehalten werden. Derzeit sind 14 Mitglieder der Caspasefamilie beim Menschen bekannt. Die Caspasen bilden überwiegend Heterotetramere mit zwei katalytischen Zentren.

Caspasen werden konstitutiv und ubiquitär als Zymogene beziehungsweise Proenzyme (30-50 kDa) synthetisiert, sie bestehen aus einer variablen Prodomäne, einer großen (20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (10 kDa). Die Heterotetramerstruktur aktivierter Caspasen entsteht durch Abtrennung der Prodomäne und Zusammenlegen von zwei mal zwei Untereinheiten mit zwei unabhängig funktionierenden katalytischen Einheiten (Thornberry und Lazebnik, 1998), siehe Abbildung 10.

GSK-3 kann Apoptose als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli wie DNS-Schäden (Watcharasit et al., 2002), Hypoxie (Loberg et al., 2002), Behandlung mit Staurosporine und Hitzeschock (Bijur et al., 2000), Entzug von NGF (nerve growth factor, Pap und Cooper, 1998) oder BDNF (Brain-derived neurotrophic factor, Johnson-Farley et al., 2006) induzieren. Dabei kann die GSK-3 Zelltod über den mitochondrialen, intrinsischen Weg induzieren und gleichzeitig den Rezeptor-vermittelten, extrinsischen Weg hemmen (Beurel und Jope, 2006). Die GSK-3 kann also wichtige Schritte in jeder der zwei Todessignalwege beeinflussen, aber in unterschiedlicher Weise. Infolgedessen können GSK-3-Inhibitoren vor dem intrinsischen Weg geschützt werden aber zugleich die Apoptose über den extrinsischen Weg aktivieren.

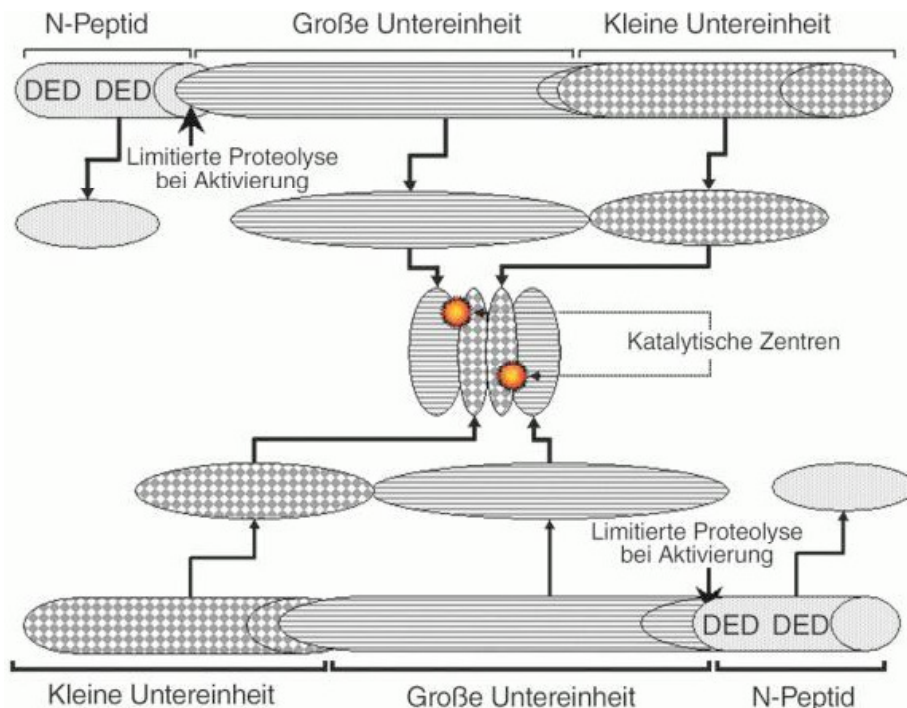


Abbildung 10: Eine Aktivierung der Caspasen erfolgt in der Mehrzahl der Familienmitglieder dieser Enzyme über die Abtrennung der Prodomäne mittels limitierter Proteolyse. Diese wird infolge proapoptotischer Signale gestartet. Die nachfolgende Assoziation zweier dimerer Untereinheiten (je eine große und eine kleine Untereinheit) zur aktiven Heterotetramerstruktur mit zwei katalytischen Zentren führt zum vollständig aktivierten Enzym. DED: Death Effector Domain (Todeseffektordomäne). Stark vereinfachtes Modell, verändert nach Salvesen und Dixit, 1999.

Hinsichtlich ihrer Funktion unterscheidet man Initiatorcaspasen (Caspase-8, -9 und -10), die autokatalytisch aktiv werden und mit speziellen Adapterproteinen interagieren und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) die durch Initiatorcaspasen aktiviert werden und bestimmte Substrate spalten (siehe Tabelle 3).

Funktion	Caspase	Prodomäne und Adapterelement
Initiatorcaspasen	Caspase-8, -9, -10	lang: DED (-8, -10) oder CARD (-2, -9)
Effektorcaspasen	Caspase-3, -6, -7	kurz: ohne DED oder CARD
Zytokinprozessoren	Caspase-1, -4, -5, -11, -14	lang: CARD

Tabelle 3: Funktionelle Zuordnung der Caspasesubtypen und die dazugehörigen Proteininteraktionsstrukturen (DED: "Death Effector Domain"; CARD: "Caspase Recruitment Domain").

Initiatorcaspasen werden zunächst durch Protein-Protein-Interaktionen aktiviert. Sie leiten die ersten proapoptotischen Stimuli durch Spaltung und Aktivierung untergeordneter Caspasen als Caspasekaskade weiter. Die Caspase-8 initiiert überwiegend die Signaltransduktion im Rezeptorvermittelten Typ-I-Weg, während Caspase-9 für die mitochondriale Apoptose (Typ II) und Caspase-12 für die Vermittlung durch zellulären Stress (Typ III) erforderlich sind. Caspase-3 ist die wichtigste der



Effektorcaspasen, ihre Aktivierung markiert den Tod der Zelle. Während der terminalen Exekution werden zahlreiche wichtige Zellstrukturproteine und Reparaturenzyme der DNS und diese selbst abgebaut (zum Beispiel PARP, Lamin B, Histon H1). Die Substratspaltung führt letztlich zur Unterbrechung von Signalübertragungen, Inhibition der Genexpression, Arretierung des Zellzyklus, Verlust von DNS-Reparaturfunktionen, Fragmentierung chromosomaler DNS und schließlich zum Abbau nukleärer und zytoplasmatischer Strukturproteine und damit zu den typischen morphologischen Merkmalen apoptotischer Zellen (siehe Abbildung 11).

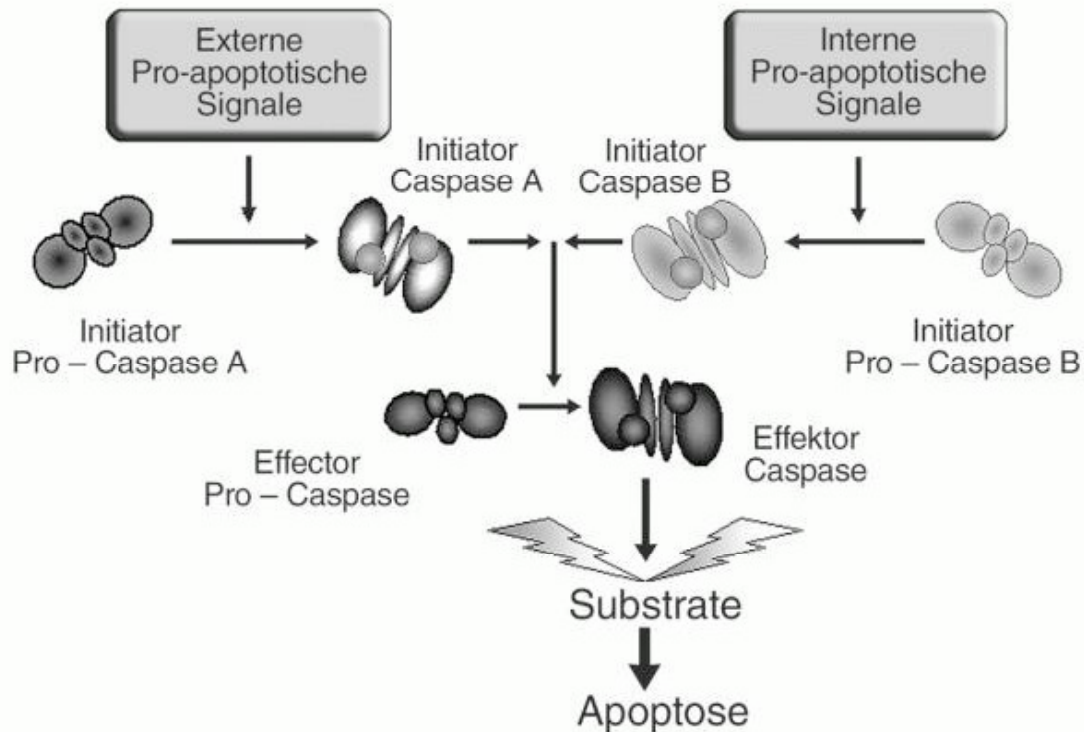


Abbildung 11: Modell der Signalübermittlung in der Caspasenkaskade des programmierten Zelltodes. Heterotetramere Effektorcaspasen werden durch vorgeschaltete heterotetramere Initiatorcaspasen aktiviert, wenn diese zuvor aktiviert worden sind. In Abhängigkeit des Ursprunges der Todessignale (intern oder extern) werden unterschiedliche Caspasesubtypen aktiviert. Daraus ergeben sich bevorzugte Signalwege, die jedoch auch partiell überlappend genutzt werden können (Abbildung verändert nach Nicholson, 1999).

Zur Zeit sind 280 Proteine bekannt, die durch Caspasen gespalten werden (Fischer et al., 2003). Dazu gehören unter anderen Regulatoren der Apoptose, Rezeptoren und Proteine vieler Signalwege, Zelladhäsionsproteine, Proteine des Kern- und Zytoskeletts, Regulatoren des Zellzyklus und der DNS-Synthese, -Degradation und -Reparatur, Zytokine, Proteine und Regulatoren der Transkription und Translation.



## 1.10 Aktivierungswege der Caspasekaskade

### 1.10.1 Aktivierung durch Todesrezeptoren

Membranständige Todesrezeptoren leiten ein von außen kommendes zytotoxisches Signal in einem triphasischen Prozeß weiter. Nach Aktivierung einer Initiatorcaspase über einen Todesrezeptor folgt die mitochondriale Amplifikation des Signals oder direkt die Aktivierung der Effektorcaspasen.

Aktiviert werden die membranständigen Todesrezeptoren durch spezifische Liganden. Die Bindung dieser Liganden an ihren entsprechenden Rezeptor führt nach Rekrutierung spezifischer Adaptermoleküle zur Aktivierung der Initiatorcaspasen-8 oder -10.

Die Todesrezeptoren sind Mitglieder der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Rezeptor-Superfamilie, die insgesamt aus 29 Rezeptoren und 19 Liganden besteht. Sie sind nicht nur für die Induktion von Zelltod verantwortlich, sondern üben auch wichtige Funktionen in immunologischen, Differenzierungs- und Überlebens-Signalwegen aus (Aggarwal, 2003). Alle Mitglieder der Familie besitzen extrazellulär mehrere Cystein-reiche Domänen, die der Ligandenbindung dienen. Intrazellulär befindet sich bei einigen Rezeptoren, vor allem den Apoptose-vermittelnden Mitgliedern, eine so genannte Todesdomäne, über die im Zytoplasma nach Rezeptoraktivierung hochmolekulare Signalkomplexe gebildet werden. Folgende sechs Todesrezeptoren sind am meisten bekannt: TNF-R1 (CD120a), Fas (CD95, Apo1), TRAMP (DR3, Apo3), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5, Apo2) und DR6. Die Apoptose wird durch Rezeptor-Oligomerisierung mittels folgender Todesrezeptorliganden vermittelt: TNF für TNF-R1, FasL für Fas, Apo3L für TRAMP, TRAIL für TRAIL-R1 und -R2. Anschließend wird ein Adapterprotein (FADD, TRADD, RIP, TRAF-2) durch die Interaktion der entsprechenden Todesdomänen rekrutiert. Die Adapterproteine interagieren dann ihrerseits mit einer Procaspase: Diese wird autoproteolytisch in die aktive Caspase umgewandelt und leitet die Caspase-Kaskade ein.

Für die Bindung des Fas-Rezeptors und des Fas-Liganden existieren zwei Modelle. Das Modell der Post-Liganden-Trimerisierung beschreibt die Bindung durch ein Homotrimer des Fas-Liganden, welcher drei monomere Fas-Rezeptoren bindet. Dieses führt schließlich zur Assoziation des trimeren Rezeptors. Das neue Modell der Prä-Liganden-Trimerisierung beschreibt zunächst die Trimerisierung des Fas-Rezeptors vor der Bindung des Fas-Liganden (Siegel et al., 2000).

Das Fas-Rezeptor/Fas-Ligand-System wird mit verschiedenen Krankheiten, wie Erkrankungen des Immunsystems und die Pathogenese von Tumoren, in Zusammenhang gebracht (O'Connell et al., 1999, Krammer, 2000; Siegel et al., 2000). Fas enthält im zytoplasmatischen Teil eine konservierte Proteintodesdomäne (DD: "death domain"), die nach der Trimerisierung von Fas durch Bindung von Fas-Ligand eine Ankopplung des Adaptermoleküls FADD ("Fas-associated protein with death domain") ermöglicht. FADD weist ebenso wie der Rezeptor eine Todesdomäne auf, mit der es an die komplementäre Todesdomäne des Rezeptors bindet. Zusätzlich verfügt es über eine Todeseffektordomäne (DED: "death effector domain"), die die Procaspase-8 über homophile DED-DED-Bindung rekrutiert und in die aktive Form überführen kann (Fernandes-Alnemri et al., 1996).

In sogenannten Typ I-Zellen kann Caspase-8 direkt andere Caspasen aktivieren. Die Procaspase-8 oder -10, ein Adapterprotein und der trimerisierte Todesrezeptor bilden das Multiproteinkomplex DISC ("death inducing signaling complex"). Die Rekrutierung der Procaspase-8 in den DISC führt zur autokatalytischen Aktivierung dieses Enzyms. Je nach Todesrezeptor werden unterschiedliche Adaptermoleküle verwendet wie FADD ("Fas-associated death-domain"), TRADD ("TNF-associated death domain"), RIP ("receptor-interacting protein kinase 1") und DAXX ("death-associated protein"). Siehe Abbildung 12.

In Typ II-Zellen werden aus bisher unbekanntenen Gründen nur geringe Mengen an DISC gebildet. Dies hat zur Folge, dass nur limitierende Caspase-8 Aktivität induziert wird und damit eine Verstärkung über einen anderen Signalweg benötigt wird. Hierbei spielt das Caspase-8 Substrat BID ("Bcl-2 interacting domain death agonist"), ein Mitglied der BH-3 only Untergruppe der Bcl-2-Familie, eine wichtige Rolle. Nach der Caspase-8 vermittelten Spaltung von BID transloziert dessen C-terminales Fragment tBID ("truncated BID") zu den Mitochondrien und aktiviert dort den intrinsischen Signalweg (Scaffidi et al., 1998). Siehe Abbildung 12.

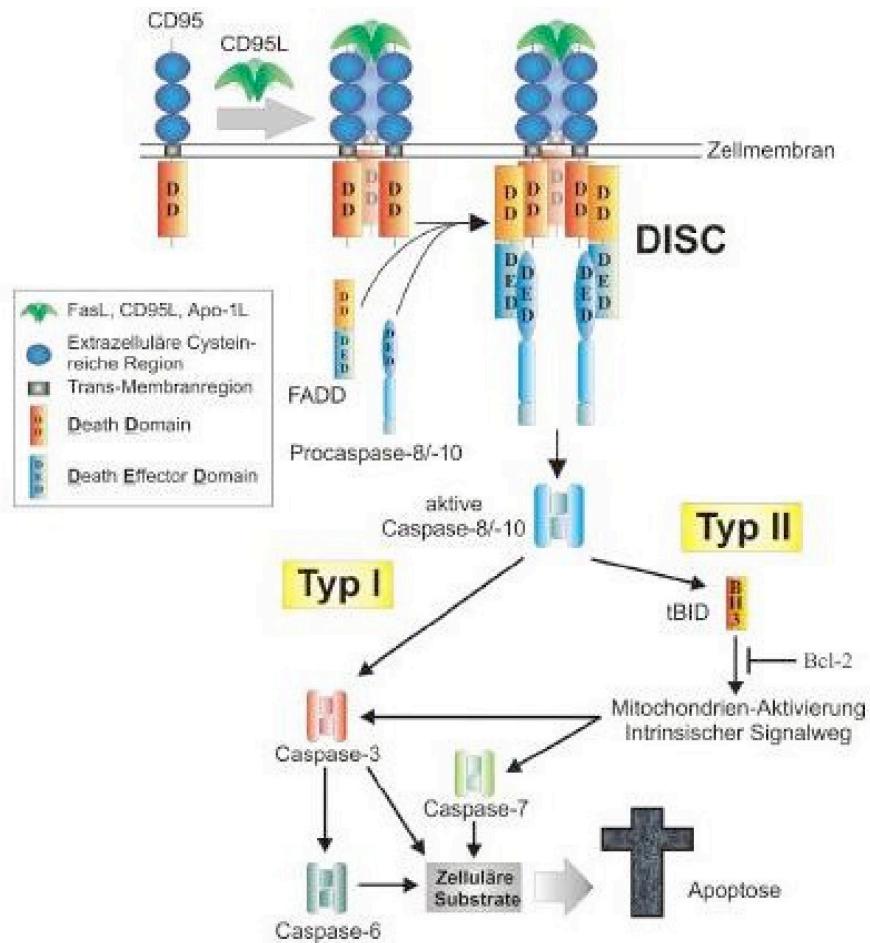


Abbildung 12: Typ I und II der CD95-induzierten Apoptose. Nach der durch den CD95-Liganden (CD95L) induzierten Oligomerisierung des CD95-Rezeptors wird der DISC ("death inducing signaling complex") über die Rekrutierung von FADD und Procaspase-8/-10 gebildet. In Typ I-Zellen wird dadurch genügend Caspase-8/-10 aktiviert, um über eine direkte Prozessierung von Caspase-3 Apoptose auszulösen. Typ II-Zellen dagegen benötigen eine

Signalverstärkung über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von BID, welches den intrinsischen Signalweg aktiviert, der wiederum durch Bcl-2 inhibiert werden kann (Bild modifiziert aus [www.sgul.ac.uk](http://www.sgul.ac.uk)).

### 1.10.2 Mitochondriale Apoptose

Die mitochondriale Signalkaskade kann durch viele unterschiedliche Stimuli, die eine Zellschädigung hervorrufen, ausgelöst werden. Einige Beispiele dazu sind DNS-Schäden, Todesrezeptoren (siehe Abbildung 12), oxidativer Stress oder Stress des endoplasmatischen Retikulums (Kroemer et al., 1998). Pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie sind wichtige Komponenten, die das apoptotische Signal zu den Mitochondrien weiterleiten (Green und Reed, 1998). Bax zum Beispiel unterzieht sich einer Reihe von aktivierenden Konformationsänderungen, so dass es vom Zytoplasma in die Mitochondrien wandert, mit der mitochondrialen Membran oligomerisiert und das anti-apoptotische Protein Bcl-2 hemmt. Die Oligomerisierung von Bax mit der äusseren Membran des Mitochondriums trägt dazu bei, dass das Potenzial der Membran zerstört wird und apoptotische Proteine aus dem Intermembranraum in das Zytoplasma freigesetzt werden.

Bei der Initiierung der Apoptose wird eine Kaskade in Gang gesetzt, wobei p53 pro-apoptotische Proteine wie Bax und Bak aktiviert und anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> inhibiert werden. Im Verlauf der Apoptose verschiebt sich das Gleichgewicht der pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie zugunsten proapoptotischer Proteine. Die Proteine Bax und Bak permeabilisieren die äussere Membran der Mitochondrien und setzen somit Faktoren frei, welche die Aktivierung von Caspasen direkt induzieren oder erleichtern, wie zum Beispiel Cytochrom c.

Cytochrom c, ein Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium, ist der entscheidende Faktor, der bei der Aktivierung dieses Signalweges ins Zytoplasma freigesetzt wird. Es folgt der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembran-Potenzials  $\Delta\Psi_m$ . Cytochrom c bindet im Zytoplasma an Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor), wodurch in Gegenwart von dATP/ATP dessen Heptamerisierung ausgelöst wird (Li et al., 1997). In dieser heptamerisierten Form kann Apaf-1 über seine CARD ("caspase recruitment domain") die Caspase-9 rekrutieren, die so analog zur Caspase-8 im DISC prozessiert und aktiviert wird. An diesem Apoptosom genannten, hochmolekularen Komplex werden nun in definierten Reihenfolge durch Caspase-9 die Effektorcaspasen-3/-7 direkt und anschließend Caspase-6 indirekt prozessiert und aktiviert (Slee et al., 1999), welche dann durch die gezielte Spaltung ihrer Substrate für den ordnungsgemäßen Ablauf des apoptotischen Programms sorgen (siehe Abbildung 13).

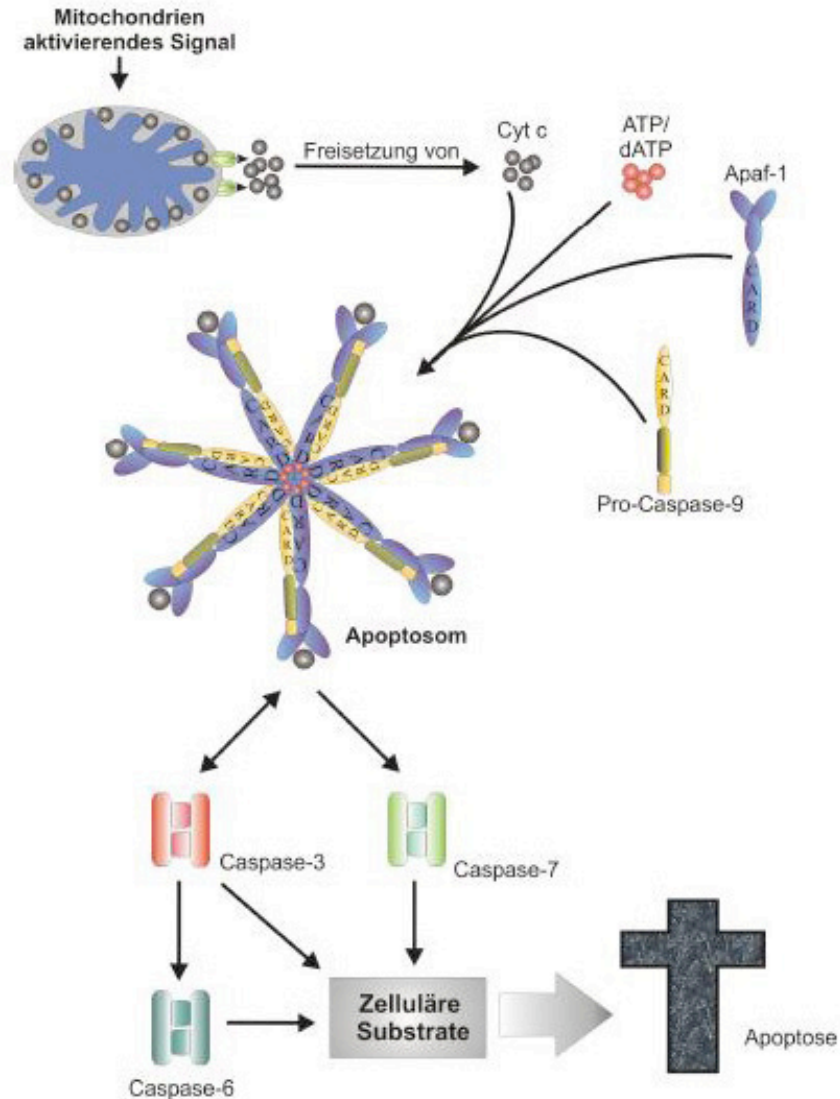


Abbildung 13: Der intrinsische Apoptoseweg (vereinfachtes Schema).

Nach Aktivierung der Mitochondrien wird durch die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma die Bildung des Apoptosoms induziert. Cytochrom c und ATP/dATP binden an Apaf-1 und führen zu dessen Heptamerisierung. Dadurch kann Procaspase-9 an die freigelegte CARD ("caspase recruitment domain") von Apaf-1 binden und wird aktiviert. Am Apoptosom werden anschließend die Effektorcaspasen-3 und -7 direkt und Caspase-6 indirekt aktiviert, was letztendlich zur Apoptose führt (Abbildung von Sandra Hoffarth, Universität Mainz).

Unabhängig hiervon bewirkt Cytochrom c die direkte Oxidation von membranständigem und dem Zytoplasma zugewandtem Phosphatidylserin (PS). Es reguliert eine Hemmung der membranassoziierten Aminophospholipidtranslokase mit dem Ergebnis eines sich selbst perpetuierenden Verlustes der Membransymmetrie und einer konsekutiven Externalisierung von PS. Außerdem können Mitochondrien den AIF ("apoptosis-inducing factor") freisetzen, der direkt auf ihre Membranenpermeabilisierung und die DNS einwirken kann, um somit eine Caspase-unabhängige Apoptose einzuleiten.

GSK-3 phosphoryliert und somit aktiviert Bax am Serin 163. Dadurch kann GSK-3 direkt diesen Mitochondrien-vermittelten Apoptoseweg aktivieren. Durch die Regulation der Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen, ist es der GSK-3 möglich den Schwellenwert in Richtung des intrinschen Weges zu steuern (Beurel und Jope, 2006).

### **1.10.3 Stressvermittelte Apoptose**

Durch oxidative Noxen, Überexpression von Proteinen oder verändertem Kalziumspiegel der Zelle kann Stress am endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgelöst werden. Hält dieser Stress längere Zeit an, führt er zu einer Funktionsstörung des ER, besonders zur Störung der Kalzium-Homöostase mit Verlust von Kalzium aus dem ER. Dies kann entweder direkt die Procaspase-12 in der Membran des ER aktivieren oder aber durch Translokation des Kalziums in die Mitochondrien zur Aktivierung des intrinsischen Signalwegs führen (Nakagawa et al., 2000).

### **1.10.4 Alternative Signalwege**

Alternative, auch caspaseunabhängige Signalwege des PCD wirken über Fettsäuren und deren Oxidationsprodukte, damit sie die proteingebundenen Signaltransduktionen direkt am Mitochondrium durch die Freisetzung von Cytochrom c und damit den Zelltod bewirken (Susin et al., 1999).

Über den ebenfalls am Mitochondrium freigesetzten AIF ("apoptosis inducing factor") kann eine Aktivierung von Caspase-3-ähnlichen Caspasen (Caspase-6 und -7) erfolgen. Die finale Aktivierung von Caspase-3 und die Cytochrom c-Freisetzung am Mitochondrium perpetuieren dann die Externalisierung von Phosphatidylserin an der Membran.

Abweichende Signalwege werden auch bei der Schädigung von Zellen durch reaktive Sauerstoffspezies beobachtet (Leist und Jaattela, 2001). Hier entscheidet die aktuelle Energiebilanz über den Weg des Zelltods (PCD, sekundäre Nekrose nach primärer apoptotischer Signaltransduktion oder primäre Nekrose).

## **1.11 Vernetzung der Signalwege**

Regulatorische Proteine stellen weitere Zielstrukturen von Caspasen dar. Durch die Spaltung von Bid zu tBid (truncated Bid) wird ein mitochondrialer Amplifikationsweg eingeleitet. Dies wird über Apaf-1/Caspase-9 realisiert. tBid transloziert direkt zum Mitochondrium und führt zur Freisetzung von proapoptotischem Bax/Bak unter konsekutiver Bildung des Apoptosoms. Bei der stressvermittelten Signaltransduktion der Apoptose werden verschiedene Kinasen (MEK-Kinase 1, Mstl und p21-aktivierte Kinase 2/hPak65) durch Caspasen aktiviert und liefern ein Amplifikationsignal über die N-terminale c-Jun-Kinase (JNK): Interaktionen zwischen Signalwegen sowie Verstärkermechanismen erschlossen. Die direkte Spaltung von Procaspase-9 durch

Caspase-3 sowie von Procaspase-3, -8 und -10 durch Caspase-6 autoamplifiziert ferner die terminale Exekution.

### **1.12 Kontrolle der Signalkaskaden**

Die Aktivierung der Signalkaskade kann von verschiedenen Startpunkten aus geschehen. Einmal aktiviert unterliegt sie aufgrund der Caspasenstruktur einer Eigendynamik und endet mit dem zielgerichteten Tod der Zelle. Ein solches System muss daher exakt ausbalanciert werden. Hierfür gibt es Regulatoren an zahlreichen Angriffspunkten. Während die Proteine der Bcl-2-Familie direkt an der Signalkaskade beteiligt sind, inhibieren die sogenannten IAP ("inhibitor of apoptosis", virale Proteine) direkt die Caspasen. Die IAP repräsentieren Proteine, die die Exekution der Apoptose in zum Beispiel viral-infizierten Zellen blockieren. Die Familie der *IAP*-Gene ist evolutionär konserviert. Ihre Produkte sind an der Regulation des PCD vom Insekt bis zum Menschen beteiligt. Überexpression führt zur Unterdrückung der Signaltransduktion innerhalb der Signalkaskade. Humane X-chromosomal gebundene IAP (XIAP) inhibieren direkt die Caspasen-3 und -7.

### **1.13 Kontrolle der nukleären Degradation**

Der Abbau der DNS erfordert zunächst eine Überwindung des exakt geregelten Zellzyklus. Wichtige Elemente der Kontrolle sind das Tumorsuppressorprotein p53, das Onkoprotein Mdm2 und unterschiedliche Nukleasen. Die nukleosomale Fragmentierung der DNS ist ein typisches Merkmal der Apoptose und wird durch die Aktivierung von Endonukleasen in zum Tode verurteilten Zellen induziert. Einige der wichtigen Proteasen sind: ICAD/CAD (Inhibitor der/Caspase-aktivierte DNase), Endonuklease G und die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP).

Apoptose wird über eine Reihe von Proteasen, die zu der Familie der Caspasen gehört reguliert: Eine Caspase-aktivierende Desoxyribonuklease (CAD) und ihr Inhibitor ICAD befinden sich in der zytoplasmatischen Fraktion der Zellen. Das CAD-Protein enthält 343 Aminosäuren und besitzt eine NLS-Domäne ("nuclear localization signal"). ICAD existiert als kurze und lange Form. Rekombinantes ICAD hemmt spezifisch den CAD-induzierten Abbau nukleärer DNS und ihre DNase Aktivität. ICAD fungiert für CAD während seiner Synthese als Chaperon und bildet ein Komplex mit CAD um seine DNase Aktivität zu unterbinden. Die Aktivierung der Caspasen, welche über Apoptosestimuli eingeleitet wird, spaltet ICAD aus dem Komplex und erlaubt CAD in den Zellkern zu gelangen und sie dann zu fragmentieren.

Die Endonuklease G ist eine Mitochondrien-spezifische Nuklease, die während der Apoptose in den Zellkern transportiert wird. Sobald sie aus den Mitochondrien freigesetzt wird, spaltet sie die DNS auf einer Caspasen-unabhängigen Art.

PARP, ein Reparaturenzym das spezifisch an DNS-Strangbrüche bindet, die durch die Einwirkung der Nukleasen bei beginnender Apoptose entstehen, ist ein weiteres Zielprotein von Caspasen. Infolge der Schädigungen der DNS knüpft aktiviertes PARP Poly-ADP-Ribose-Reste unter Verbrauch von ATP und  $\text{NAD}^+$  an nukleäre Proteine und interagiert mit DNS-Polymerase- $\alpha$ . Es ist ein hochkonserviertes nukleäres Enzym, das aus einer DNS-Bindedomäne, einer Automodifikationsdomäne und einer katalytischen Domäne besteht. PARP wird durch Caspase-3 in zwei Fragmente von 89 kDa (katalytisches Fragment) und 24 kDa (DNS-Bindungsfragment) gespalten und inaktiviert. Da diese proteolytische Spaltung von PARP nur beim apoptotischen Zelltod auftritt, kann man Apoptose eindeutig von Nekrose unterscheiden.

## 2. Zielsetzung

In meiner Diplomarbeit habe ich festgestellt, dass nach Behandlung der Tumorzellen mit den GSK-3 Inhibitoren LiCl und Alsterpaullon die Anzahl der proliferierenden Zellen stark abgenommen hatte. Meine Vermutung war, dass eine Art von Zelltod eingeleitet würde. Im Fall der von mir untersuchten primären Zellen konnte ich keine Anzeichen eines Zelltods bemerken, und nach dem Entfernen des Inhibitors war es den Zellen sogar möglich zurück in die Wachstumsphase zu kehren.

Diese Wirkung wurde schon in Vorversuchen bestätigt. Dabei führte die Inhibition von GSK-3 durch LiCl oder Alsterpaullon in Tumorzellen binnen 24 bis 48 Stunden zum Zelltod. Bei primären Zellen waren hingegen keine Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Vitalität festzustellen.

Das Ziel meiner Doktorarbeit war zu untersuchen, ob die Inhibition der GSK-3 Einfluss auf das Tumorwachstum hat. Um über diese Möglichkeit zu entscheiden, waren im Wesentlichen folgende Fragen zu klären:

- a) Welche Art von Zelltod wird nach Inhibition von GSK-3 in den Tumorzellen ausgelöst und durch was für einen Mechanismus?
- b) Bleiben primäre Zellen von der Auslösung des Zelltodes verschont? Wenn ja, wird in primären Zellen der Zellzyklus arretiert?
- c) Ist der Zelltod nach GSK-3-Inhibition abhängig vom p53-Status? Falls Nein, durch welchen alternativen Mechanismus lösen die benutzten GSK-3-Inhibitoren LiCl und Allsterpaullon den Zelltod aus?
- d) Reduziert die Inhibition von GSK-3 das Tumorwachstum im Rattenmodell?
- e) Ist die Auslösung des Zelltods auf die Inhibition von GSK-3 zurückzuführen oder wird er eventuell durch unspezifische Nebenwirkung der Inhibitoren hervorgerufen?

Die Identifizierung und Charakterisierung selektiver Inhibitoren für GSK-3 könnte als Ziel, dessen Anwendung in der Tumorthherapie haben. Weil GSK-3 Mitglied verschiedener Signalwege ist, könnte das selektive Ausschalten einzelner Aufgabenhier speziell zum Vorteil werden.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Acrylamidmix	Carl Roth, Karlsruhe
AEC-Lösung	DCS Innovative Diagnostik-Syteme,
Alsterpaullon	Calbiochem, USA
DAPI	Sigma-Aldrich, München
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Draq5™	Biostatus Limited, England
Ethanol 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Etoposid	Calbiochem, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Hämatoxyllin	Sigma, Hamburg
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Carl Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
LiCl (8M sterile Lösung)	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
MDC	Sigma-Aldrich, München
Methanol 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Methozell 4000 cpi	Fluka, Schweiz
N,N-Dimethyl Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphorsäure 85%	Carl Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Qiagen, Hilden
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A	Qiagen, Hilden
StrepABCComplex/HRP	DakoCytomation, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
tri Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

### 3.1.2 Geräte

ELISA-Messgerät	BMG Labtech, Offenburg
FACS Maschine	Becton Dickinson, Heidelberg
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Kamera Hamamatsu Multi Format CCD	Hamamatsu Photonics, Japan
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Mikrotom Leica RM 2155	Leica, Wetzlar
Objekträger Super Frost Plus	Roth, Karlsruhe
Paraffineinbettungsmaschine	Shandon Hypercenter XP, GMI, USA
Stereo Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert, Göttingen
UV-C Lampe	Vetter, Wiesloch
verbesserte Neubauer Zählkammer	Sigma-Aldrich, München

### 3.1.3 Größenstandards, Kits und Matrices

Gene Ruler™ DNS-Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Apoptag Kit	Chemicon / Biocompare, USA
Caspase-3 Aktivitätkit	Clontech, USA
Caspase-9 Aktivitätkit	Clontech, USA
KOD Polymerase Kit	Novagen, Toyobo, USA
PeqGOLD Gel Extraktion Kit	Peqlab, Erlangen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Protein A Sepharose	Amersham, Freiburg

### 3.1.4 Doppelsträngige siRNA, Oligonukleotide

Kontroll siRNA Zielsequenz	Qiagen, Hilden
AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT	
GSK-3 siRNA	MWG, Erlenberg
GSK-3 $\alpha$ Zielsequenz	
5' - CAUUCUCAUCCCUCCUCACUU - 3'	
5' - AAGUGAGGAGGGAUGAGAAUG - 3'	
GSK-3 $\beta$ Zielsequenz	
5' - GAGCAAUCAGAGAAAUGAAC - 3'	
5' - GUUCAUUUCUCUGAUUUGCUC - 3'	

Die Primer für die PCR wurden bei der Firma Metabion, Martinsried bestellt.

p53 forward (Ratte):

5' - GGA TGC CGA ATT CTT GAA AAT GGA GGA TTC ACA GTC GG - 3'

p53 reverse (Ratte):

5'-GAT ACG GGC GGC CGC TCA GTC TGA GTC AGG CCC C - 3'

### 3.1.5 Restriktionsenzyme und Puffer

Alle Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma Fermentas, bezogen.

### 3.1.6 Membranen, Filme und Plastikwaren

Immobilon P (PVDF)-Membran	Amersham, Freiburg
ECL Filme	Amersham, Freiburg
Plastikware für die Zellkultur	Greiner Labortechnik, Nürtingen

### 3.1.7 Glaswaren

Alle verwendeten Glaswaren wurden von den Firmen VWR (Darmstadt), Neolab (Heidelberg) oder Omnilab (Bremen) bezogen. Die Sterilisation erfolgte 5 Stunden in einem Wärmeschrank (Modell 800, Memmert GmbH & CoKG, Schwabach).

### 3.1.8 Antikörper

1) primäre Antikörper

Bcl-X <sub>L</sub>	polyklonaler Antikörper in Kaninchen produziert, Cell Signaling, USA
Caspase-3	polyklonaler Antikörper in Kaninchen produziert, Cell Signaling, USA
Caspase-8 (1C12)	polyklonaler Antikörper in Maus produziert, Cell Signaling Technology, USA
Cytochrom c	polyklonaler Antikörper in Maus produziert, BD Pharmingen, Heidelberg
GSK-3 $\alpha$ (H12)	polyklonaler Antikörper in Maus produziert, Santa Cruz, USA
GSK-3 $\beta$	polyklonaler Antikörper in Maus produziert, Cell Signaling, USA

PARP (H-250)	polyklonaler Antikörper in Kaninchen produziert, Santa Cruz, USA
PCNA	polyklonaler Antikörper in Maus produziert, Santa Cruz, USA
PCNA (IHC)	Dako, Hamburg
p53	polyklonaler Antikörper in Kaninchen produziert, Santa Cruz, USA
RIP	polyklonaler Antikörper in Maus produziert, BD Transduction, USA
$\alpha$ -Tubulin	polyklonaler Mausantikörper, Santa Cruz, USA

## 2) sekundäre Antikörper

$\alpha$ -Maus	polyklonaler HRP-gekoppelter anti-Maus Antikörper (Ziege), Dako, Hamburg
$\alpha$ -Kaninchen	polyklonaler HRP-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper (Ziege), Dako, Hamburg
$\alpha$ -Maus (IHC)	Dako, Hamburg

## 3.2 Zellen und Zellkulturbedingungen

GM1604	normale humane epidermale Fibroblasten Bezogen vom Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA.
GM38	normale humane epidermale Fibroblasten Bezogen vom Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA.
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten (PromoCell, Heidelberg)
HDMEC	humane dermale Mikrovaskularendothelzellen (PromoCell, Heidelberg).
HCT 116 p53 <sup>+/+</sup> und p53 <sup>-/-</sup>	humane Kolonkarzinomzellen Diese Zelllinien wurden freundlicherweise von G. Taucher-Scholz (GSI Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

Jurkat	humane T-Lymphozyten Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Gerald Grabtree (Stanford Universität) über Prof. Dr. Harald Krug (Forschungszentrum Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.
MT450	Mammakarzinomzelllinie (Ratte) Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von J. Sleeman (FZK/Uniklinik Mannheim) zur Verfügung gestellt.
SaOs-2	humane Osteosarkomzellen, p53 negativ Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von C. Englert (Jena) zur Verfügung gestellt.
U2Os	humane Osteosarkomzellen (ATCC-Nummer HTB 96) Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von G. Taucher-Scholz (GSI, Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

Die GM1604- und GM38-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium, das mit 15 % fötalem Kälberserum und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin angereichert war, in feuchter Umgebung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

NHEK- beziehungsweise HDMEC-Zellen wurden in von der Firma mitgelieferten Keratinozytenmedium oder Endothelzellmedium, in feuchter Umgebung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Jurkat-Zelllinie wurde in hitzeinaktiviertes 10 % FCS/RPMI 1640-Medium, in feuchter Umgebung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die übrigen Zelllinien wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium, das mit 10 % fötalem Kälberserum und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin angereichert war, in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3.3 Methoden**

Routinemethoden und die Zusammensetzung gebräuchlicher Puffer wurden, soweit nicht anders vermerkt, dem Protokollbuch Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) entnommen. Medien wurden zur Sterilisation 20 Minuten bei 120°C in einem Autoklaven (Varioklav, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim) autoklaviert.

#### **3.3.1 Zellkultur- und Transfektionsmethoden**

##### **3.3.1.1 Zellkultur**

Alle Zelllinien wurden in einem Steri-Cult 200 Inkubator (Firma Scientific, Marietta, USA) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

##### **3.3.1.1.1 Passagieren von Zellen**

Adhärente Zellen: GM1604- und GM38-Zellkulturen wurden nach Erreichen von 90 % Konfluenz 1:5 verdünnt.

Die restlichen Zelllinien wurden nach Erreichen von 90 % Konfluenz 1:10 verdünnt. Für das Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen und durch eine 2-minütige Inkubation bei 37°C mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe der gleichen Menge DMEM-Medium inaktiviert. Die Zellen wurden durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert. Der entsprechende Anteil der Zellen wurde in eine neue Kulturflasche überführt und mit Medium versetzt.

Suspensionszellen: Nach Erreichen von 90 % Konfluenz wurden die Jurkat Zellen mit frischem RPMI 1640-Medium 1:10 verdünnt.

Die MT450-Zellen werden 1:10 mit DMEM-Medium verdünnt.

##### **3.3.1.1.2 Langzeit-Aufbewahrung und Anzucht von eukaryotischen Zellen**

Nach dem Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale mit Hilfe von Trypsin und der anschließenden Zentrifugation (siehe Passagieren von Zellen: Abschnitt 5.3.1.1.1) wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO, 20% FCS, DMEM) resuspendiert, in ein

2 ml Kryoröhrchen aliquotiert und in einer Kryobox langsam auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Zellen wurden sofort nach der Entnahme aus dem flüssigem Stickstoff aufgetaut und in 5 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 1.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und die Zellen in eine sterile Kulturflasche überführt. Nach der Anheftung der Zellen an die Kulturflasche wurde das Medium gewechselt und die Zellen, wie oben beschrieben, weiter kultiviert.

### 3.3.1.1.3 Bestimmung der Zellproliferation

In das Loch einer 24-Lochplatte wurden  $10^4$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium pipettiert und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden Lithiumchlorid (unterschiedliche Endkonzentrationen) oder Alsterpaullon (Endkonzentration 5 oder 10  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Die Zellzahl wurde an den drei darauf folgenden Tagen bestimmt. Dazu wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden 1 Mal mit PBS gewaschen und mit 200  $\mu\text{l}$  Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Nach Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  DMEM-Medium wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und kurz bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 80  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen.

Die Zellzahl wurde anhand der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Anzahl der Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsstufe}$$

Die Zellen wurden wie folgt in einer verbesserten Neubauer-Kammer (30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte, Tiefe 0,1 mm) unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung gezählt. Das Zählgitter besteht bei der dieser Neubauer-Zählkammer aus 3 x 3 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge und somit einer Fläche von je 1  $\text{mm}^2$ . Die Zellen innerhalb der 5 x 5 Gruppenquadrate wurden gezählt und daraus ein Mittelwert gebildet.

Um die Vitalität der Zellen zu prüfen, wurde die Trypanblau-Lösung angewandt.

Die Zellsuspension wurde mit 20  $\mu\text{l}$  einer 1 % Trypanblaulösung versetzt und 10  $\mu\text{l}$  dieser Mischung sofort in den Spalt zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Dabei wurden nur die Zellen gezählt, die sich in den 16 Quadraten im Zentrum der Neubauer-Kammer befanden. Damit Zellen, die sich auf Begrenzungslinien befanden nicht doppelt gezählt oder bei der

Zählung vernachlässigt wurden, wurden bei der Zählung nur Zellen berücksichtigt, welche sich an zwei Seiten zum Beispiel auf der linken und oberen Begrenzungslinie befanden.

Bei allen Zählungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt: Nach dem Auszählen des oberen Zählnetzes wurde auch das untere Zählnetz ausgezählt und der Mittelwert daraus bestimmt.

### 3.3.1.1.4 Transfektion von siRNA mit Lipofectamine<sup>TM</sup>2000

Am Tag der Transfektion wurden U2Os-Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und  $2 \times 10^6$  Zellen ausplattiert. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium durch 8 ml Transfektionsmedium (DMEM, ohne FCS und ohne Penizillin/Streptomycin) versetzt.

Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde das verdünnte Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (1  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 in 50  $\mu\text{l}$  DMEM, ohne FCS und ohne

Penizillin/Streptomycin) mit den verdünnten Oligonukleotiden (20 pmol siRNA in 50 µl DMEM, ohne FCS und ohne Penicillin/Streptomycin) gemischt und zur Komplexbildung weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden zu jeder Schale 2 ml DMEM mit dem Oligonukleotid-Lipofectamine™2000-Komplexen zugetropft und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Proben geerntet und falls nicht sofort weiter verwendet bei -80°C eingefroren.

#### **3.3.1.1.5 Behandlung von Zellen mit GSK-3-Inhibitoren**

LiCl wurde in unterschiedlichen Endkonzentrationen verwendet, wobei die höchste Konzentration 50 mM betrug (Stammlösung 8M).

Alsterpaullon wurde als 10 mM Lösung in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 5 beziehungsweise 10 µM verwendet.

#### **3.3.1.1.6 Behandlung der Zellen mit UV-C-Strahlung**

Die Bestrahlung mit UV-C-Strahlung erfolgte in 200 µl PBS mit einer 15 Watt Lampe der Firma Vetter GmbH, Wiesloch bei einer Dosisrate von 50 Joule/m<sup>2</sup> für 31 Sekunden. Die Zellen wurden dafür pelletiert, in PBS aufgenommen und zurück in der Petrischale gesetzt. Die Proben wurden in der Petrischale ohne Deckel bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen in dem alten Medium aufgenommen und für die entsprechenden Zeiten zurück im Brutschrank gestellt.

#### **3.3.1.1.7 Kolonie-Experiment**

Suspensionszellen: Es wurde eine Methylzellulose-Stocklösung angesetzt. 1,2 g Methylzellulose 4000 cpi wurde hierfür in 50 ml Basalmedium DMEM-Medium resuspendiert und autoklaviert. Dazu wurden weitere 50 ml Basalmedium DMEM zugegeben und bei 4°C über mehrere Tage durch Rühren gelöst. Anschließend wurde die Lösung für 2 Stunden bei 2500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der dickflüssige Überstand wurde mit 10 % FCS versetzt und weiterverwendet.

Die Zellen werden wie gewohnt trypsinisiert. Je 100 Zellen pro Probe wurden in einer 6-Lochplatte mit Methylzellulose und der entsprechenden Menge LiCl-Lösung gemischt. Die Proben wurden für zwei Wochen im Brutschrank bei 37°C inkubiert und die gebildeten Kolonien gezählt.

Adhärenz Zellen: Die Zellen wurden mit Trypsin vom Boden der Platte gelöst. Je 200 Zellen/Probe in 6 cm-Petrischalen angesetzt und mit der entsprechenden Menge an LiCl behandelt. Dann wurden die Zellen für zwei Wochen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 %-igem Methanol für 5 Minuten fixiert. Die Proben wurden mit 0,5 % Kristallviolett-Lösung angefärbt. Die entstandenen Kolonien wurden gezählt und die Ergebnisse als Diagramm dargestellt.



### **3.3.1.1.8 Bestimmung der Seneszenz: $\beta$ -Galaktosidase-Färbung**

Die zu testenden Fibroblasten befanden sich in Passage 12. Als Kontrolle wurden seneszente GM 38-Fibroblasten (Passage 25) untersucht.

100 Zellen wurden auf Glasplättchen für eine bessere Betrachtung am Mikroskop in 6 cm-Petrischalen angesetzt und mit 50 mM LiCl behandelt. Die Proben wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Die Zellen wurden 3 Mal mit PBS vorsichtig gewaschen und für 5 Minuten mit 3% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3 Mal mit destilliertem Wasser gespült und dann mit je 3 ml/Schale einer frisch angesetzten  $\beta$ -Gal-Färbelösung (bestehend aus Lösung A und B) für mindestens 18 Stunden bei 37°C (ohne CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidasefärbung wurden an einem Leica-Lichtmikroskop ausgewertet.

Die Bestandteile der  $\beta$ -Gal-Färbelösung A waren: 40 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II), 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III), 150 mM NaCl, 2 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat. Das pH 6 der Lösung wurde mit Phosphorsäure eingestellt.

Die X-Gal-Stocklösung B enthält 20 mg X-Gal/ml Formamid.

Für die  $\beta$ -Galaktosidasefärbung wurde ein Gemisch von den zwei Lösungen wie folgt angesetzt: 50  $\mu$ l Färbelösung A/ml Lösung B.

### **3.3.1.1.9 Vakuolenfärbung (MDC-Färbung)**

$2 \times 10^4$  Zellen wurden in je 100  $\mu$ l Medium aufgenommen und in 96-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Proben für die entsprechenden Zeitpunkte mit 50 mM LiCl beziehungsweise 5  $\mu$ M Alsterpaullon behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 0,05 mM MDC in PBS bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben 4 Mal mit PBS gewaschen und in 10 mM Tris-Hcl, pH 8 das mit 0,1 % Triton X-100 versetzt worden war aufgenommen. Intrazelluläres MDC wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert S100) mit einem Anregungsfilter von 380 nm und Emissionsfilter von 525 nm analysiert.

### **3.3.1.1.10 DAPI-Färbung**

Für die Analyse der apoptotischen Zellkerne wurden Zellen in 24-Lochplatten auf Glasplättchen, zur besseren Visualisierung am Mikroskop, gezogen, mit 50 mM LiCl/ 5  $\mu$ M Alsterpaullon behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet, mit einem 1:1 Azeton:Methanol-Gemisch für fünf Minuten auf Eis fixiert und mit DAPI-Lösung für 30 Minuten im Dunkeln gefärbt. Die Proben wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert S100) ausgewertet.

### 3.3.1.1.11 MTT-Experiment

1 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden in je 100 µl Medium aufgenommen und in 96-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Proben mit den entsprechenden LiCl-Konzentrationen behandelt und für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Proben mit einer Konzentration von 1 mg/ml MTT-Lösung (in Medium verdünnt) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die gebildeten blauen Formazan-Kristalle wurden in je 100 µl Isopropanol gelöst und die Extinktion am ELISA-Messgerät bei 595 nm gemessen.

### 3.3.2 Protein-Methoden

#### 3.3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde bei adhärennten Zellen das Medium abgenommen, die Zellen mit einem Gummischaber vom Boden der Kulturschale abgelöst, in 1 ml PBS aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Suspensionszellen wurden direkt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspensionen wurden 20 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und direkt lysiert oder bei -80°C aufbewahrt.

Für die Zelllyse wurde das Zellpellet in 50 µl NP40-Lysispuffer (5 mM EDTA pH 8; 50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1 % Igepal), der frisch mit PMSF versetzt worden war (Endkonzentration 1 mM), resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen wurden 10 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Das Pellet wurde verworfen.

#### 3.3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Zunächst wurde eine Eichkurve erstellt. Dafür wurden zu je 1 ml Bradford-Lösung (100 mg Coomassie Brilliant-Blue G250; 50 ml Ethanol; 100 ml 85 % Phosphorsäure; ad 11 H<sub>2</sub>O) 2 µl NP-40 Lysispuffer und 0, 2, 4 oder 6 µl einer BSA-Lösung (1 mg/ml) pipettiert. Von den Proben mit unbekannter Proteinkonzentration wurden jeweils 2 µl zu 1 ml Bradford-Reagenz pipettiert und gevortext. Aus jedem Ansatz wurden 200 µl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion an einem ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Aus dem Faktor  $m = \text{Extinktion [BSA-Eichkurve]} / \text{Konzentration [BSA-Eichkurve]}$  wurde die Proteinkonzentration der Proben mit folgender Formel bestimmt:

$$\boxed{\text{Konzentration [Protein]} = m \times \text{Extinktion [Protein]}}$$

### **3.3.2.3 Immunpräzipitation**

#### **3.3.2.3.1 Kopplung des Antikörpers an die Protein A-Sepharose**

Pro Ansatz wurden 20 µl einer Protein A-Sepharose-Mischung 25 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert. Zum Pipettieren wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit gekappter Spitze verwendet, um die Sepharose nicht zu beschädigen. Die Protein A-Sepharose wurde 1 Mal mit PBS gewaschen und mit PBS auf 500 µl aufgefüllt. Pro Ansatz wurde 2 µl Caspase-8 Antikörper zugegeben und für 2 Stunden auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 25 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Sepharose-Antikörper-Komplexe 1 Mal mit PBS gewaschen. Die Sepharose wurde in IP-Lysispuffer (10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 1 mM PMSF) resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl von 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen verteilt.

#### **3.3.2.3.2 Immunpräzipitationsreaktion**

800 µg Zelllysat wurden zu den Sepharose-Antikörper-Komplexen gegeben und auf einem Drehrad bei 4°C für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose 20 Sekunden bei 14.000 rpm pelletiert und 4 Mal mit je 500 µl IP-Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer feinen Kanüle (100 Stericam® 26G, B. Braun medical AG, Emmenbrücke, CH) vollständig abgenommen. Für die Inputkontrolle wurden 50 µg Protein verwendet.

#### **3.3.2.3.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE**

Für die SDS-PAGE wurde das “Mini-PROTEAN® 3 System” (Bio-Rad, München) verwendet.

Für die Gelelektrophorese wurden 50 µg Protein mit 2X Laemmli-Probenpuffer (160 mM Tris, HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerol; 4 % β-Merkaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau) versetzt, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend für 20 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Für die Polyakrylamid-Gele wurden Trenngele mit einer Akrylamidkonzentration von 10 % oder 12 % (375 mM Tris-HCl pH 8,8; 10 % oder 12 % Akrylamid/Bisakrylamidlösung; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,05 % TEMED) und einem Sammelgel mit einer Akrylamidkonzentration von 5 % (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 5 % Akrylamid/Bisakrylamid; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) hergestellt. Dazu wurden zwei Mini-Glasplatten mit einem Abstandhalter von 1,5 mm Stärke (BioRad) in eine Gelhalterkassette eingespannt und mit der Trenngellösung bis circa 3 cm unter der Oberkante der Glasplatte befüllt. Die Geloberfläche wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade, luftblasenfreie Ebene zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und die Geloberfläche mit Wasser gespült. Dann wurde das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, das fertige

Polyakrylamidgel in eine vertikale Elektrophorese-Kammer (BioRad) eingespannt und diese mit 1X Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM Glyzin; 0,1 % SDS) befüllt. Die vorbereiteten Proben wurden in die Taschen pipettiert und bei 150 V aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hatte.

Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein geeigneter Marker mit auf das Gel aufgebracht.

#### **3.3.2.3.4 Westernblotting und immunochemische Detektion von Proteinen**

Beim Western Blotting werden Proteingemische auf eine Membran transferiert. Auf der Membran können die Proteine anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden diese elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde eine Transfer-Kassette (BioRad) in eine Schale, die mit 1X Transfer-Puffer (25 mM Tris-HCl; 200 mM Glyzin; 10 % Methanol) gefüllt war, gelegt. Eine mit Methanol gespülte und in 1X Transfer-Puffer äquilibrierte Membran wurde zusammen mit dem Polyacrylamidgel luftblasenfrei zwischen zwei Lagen Filterpapier gelegt und in die Transfer-Kassette eingespannt. Die Transfer-Kassette wurde so in eine Transfer-Kammer (BioRad) gegeben, wobei die PVDF-Membran an der Anodenseite und das Gel auf der Kathodenseite zu liegen kam. Die Kammer wurde mit 1X Transfer-Puffer gefüllt und die Proteine bei 30 V über Nacht auf die PVDF Membran transferiert.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit einer Tintenlösung (1 µl Tinte auf 1 ml PBS) inkubiert bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran für circa 30 Minuten in 5% Magermilch-Lösung (5 g Magermilchpulver in 100 ml PBS/0,2 % Tween gelöst) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei mit einem Antikörper (entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in 5 % Magermilch-Lösung) in Plastikfolie eingeschweißt und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Rotationsplattform inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 4 Mal für 10 Minuten in PBS/0,2 % Tween gewaschen. Anschließend wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter und gegen den ersten Antikörper gerichteter sekundärer Antikörper 1:1000 in 5 % Magermilch-Lösung verdünnt, mit der Membran in Plastikfolie eingeschweißt und auf der Rotationsplattform 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 8 Mal für je 5 Minuten mit PBS/0,2 % Tween gewaschen. Die Membran wurde kurz in PBS geschwenkt, da Tween die Peroxidase inhibiert, und auf eine Glasplatte gelegt. Die ECL Nachweisreagenzien 1 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 400 µM Kumarinsäure) und 2 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,02 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran pipettiert und 2 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die ECL-Lösung entfernt, die Membran in Folie eingewickelt und in der Dunkelkammer gegen einen Hyper-ECL-Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit hing dabei von der Stärke der Signale ab.

### **3.3.2.3.5 Caspase-3/-9-Aktivitätsmessung**

Das Experiment wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Firma Clontech, USA).

### **3.3.2.3.6 Präparation von Mitochondrien und mitochondrienfreier Zellextrakte zur Bestimmung der Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol**

Die Proben wurden mit mit LiCl (50 mM) behandelt und nach den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Als Positivkontrolle dienten die Jurkat-Zellen die für 6 Stunden mit Etoposid (50 µM) behandelt wurden.

Zur Bestimmung der Cytochrom c-Freisetzung wurden  $5 \times 10^6$  Zellen geerntet, mit kaltem PBS gewaschen und in 5 Volumina Puffer A (250 mM Sucrose, 20 mM HEPES pH 7,5, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin und 10 µg/ml Aprotinin) aufgenommen. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 14.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden daraufhin 1 Stunde bei 4°C in der Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery M120S) bei 100.000 rpm zentrifugiert und die Lysate im SDS-Gel aufgetrennt.

## **3.3.3 Nukleinsäure-Methoden**

### **3.3.3.1 Isolierung apoptotischer DNS (Ray et al., 1994)**

Um fragmentierte DNS zu isolieren wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt und bei 2.000 rpm für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde für 1,5 Minuten mit 125 µl DNS-Lysispuffer (20 mM Na-EDTA; 50 mM Tris-HCl; 1 ml NP-40; pH 7,5) auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4.500 rpm, 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Extraktion mit der gleichen Menge Lysispuffer wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden mit 10 µl einer 10 % SDS-Lösung auf 1 % SDS eingestellt und bei 56°C für 2 Stunden mit 20 µl RNase A (20 mg/ml) inkubiert. Danach wurden die Ansätze bei 37°C für 2 Stunden mit Proteinase K (10 mg/ml) verdaut. Nach Zugabe von 50 µl einer frisch angesetzten 10 M Ammoniumazetatlösung und 500 µl 100 %-igem Ethanol wurde die DNS bei -20°C über Nacht gefällt. Die Proben wurden bei 4°C und 14.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das DNS Pellet in 20 µl TE-Puffer(10 mM Tris-HCl; 1 mM Na-EDTA pH 8) aufgenommen. Für die Elektrophorese wurden die Ansätze mit 5 µl Ladepuffer (0,5 M EDTA; 50 % Glycerol; 0,01 % Bromphenolblau) versetzt, für 10 Minuten auf 65°C erhitzt, auf Eis abgeschreckt und auf ein 1,4 %-igen Agarose-Gel aufgeladen.

### 3.3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese basiert auf der Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Fragmentgröße ab.

Für ein 1 % Agarosegel wurde 1g Agarose in 100 ml 1X TAE-Puffer (40 mM Tris, pH 7,2; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 60°C mit 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Die Agaroselösung wurde in eine mit einem Kamm versehene vertikale Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisation der Agarose wurde die Kammer mit 1X TAE-Puffer gefüllt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Um die Größe der DNS-Fragmente bestimmen zu können, wurde auf das Gel ein geeigneter DNS-Marker aufgetragen.

### 3.3.3.3 Isolierung der Gesamt-RNS Menge

Die Gesamt RNS-Menge aus MT450-Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen isoliert. Dabei wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt.

### 3.3.3.4 Umschreiben der RNS in cDNS

Jeder dieser Schritte wurde in der PCR-Maschine durchgeführt. Alle benutzten Reagenzien waren von der Firma Fermentas.

#### Verdau mit DNase I:

Für jede Probe wurden je zwei PCR-Röhrchen angesetzt.

Je 7 µl RNS, 1 µl DNase I, 1 µl 10X DNase-Puffer und 1 µl Ribonuklease-Inhibitor wurden gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Zur Inaktivierung der DNase I wurde dem Reaktionsgemisch 1 µl EDTA zugesetzt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

Zur Synthese des 1. Stranges wurde je 4 µl Random-Primer (50 ng/ml) zu gegeben und 5 Minuten bei 70°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden folgende Gemische vorbereitet:

- 1) 4 µl 5X Puffer, 2 µl dNTP (10mM), 1 µl MLRVT, 3 µl Wasser
- 2) 4 µl 5X Puffer, 2 µl dNTP (10mM), 4 µl Wasser

Pro Probe (mit und ohne reverse Transkriptase-Enzym) werden je 10 µl Gemisch pro Probe pipettiert und 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde noch zu jeder Probe 50 µl Wasser dazu gegeben.

### PCR-Reaktion:

7,5 µl Wasser wurden mit 2 µl 10X Puffer, 1 µl MgSO<sub>4</sub>, je 1 µl forward und reverse p53-Oligonukleotide, 4 µl cDNS, 2,5 µl dNTP (2 mM) und 1 µl KOD-Polymerase gemischt. In der PCR-Maschine wurden 40 Zyklen bei folgenden Temperaturen durchgeführt: 95°C-30 Sekunden, 55°C-30 Sekunden und 72°C-1,5 Minuten. Zur Kontrolle wurden die Proben auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen.

### **3.3.3.5 DNS-Extraktion aus dem Gel**

Die DNS-Extraktion werden mit Hilfe des peqGOLD Gel Extraction Kit der Firma Peqlab durchgeführt. Bei dieser Methode wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Sequenzierung zu der Firma Qiagen geschickt.

### **3.3.4 FACS-Analyse**

Für die FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet, bei 1.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und anschließend 1 Mal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Je 5 ml kaltes 70 %-iges Ethanol wurde durch langsames Pipettieren, bei gleichzeitigem Vortexen der Proben auf niedrigster Stufe zugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 1.600 rpm 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 250 µl PBS, das mit 1 µl Draq5<sup>TM</sup> versetzt wurde, resuspendiert und im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Proben am FACS-Gerät gemessen.

### **3.3.5 Rattenmodell**

Junge syngene Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200 und 250 g wurden in einem 12 stündigen Tag-/Nacht-Zyklus gehalten und ad libitum gefüttert. Die Tiere wurden in drei Gruppen à 8 Tiere eingeteilt. Zwei Gruppen wurden mit 50 mg/kg Körpergewicht LiCl beziehungsweise NaCl intraperitoneal gespritzt. Die letzte Gruppe wurde unbehandelt gelassen. Zehn Tage nach der ersten Behandlung wurden  $5 \times 10^6$  MT450-Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 µl subkutan injiziert. 6 Stunden nach Injektion der MT450-Mammakarzinomzellen wurde 2 Mal die Woche Blut entnommen, Plasma präpariert und die Lithiumkonzentration durch Flammenphotometrie bei einer medizinischen Firma bestimmt. Dies wurde als Serviceleistung von der Laborgemeinschaft Albtal, Ettlingen durchgeführt. Aufgrund einer möglicherweise toxischen Wirkung von LiCl und NaCl, wurden die Tiere 2 Mal pro Woche auf körperliche Veränderungen wie zum Beispiel Gewichtsverlust untersucht. Ebenfalls 2

Mal pro Woche wurden die Grössen der entstandenen Tumore mit Hilfe eines Kalipers gemessen.

Am Ende der Versuchszeit wurden die Tiere durch einen Genickbruch getötet, die Tumore präpariert und in Paraffin eingebettet. Die Präparate wurden mittels histologischer Färbungen auf Wachstums- und Apoptoserate untersucht.

#### **3.3.5.1 Plasmapräparation**

57 µl 15 % EDTA wurden in einer Spritze vorgelegt und anschließend circa 5 ml Blut aus dem Schwanz der Ratten entnommen. Die Blutproben wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der das Plasma enthält, wurde abgenommen und bis zur Bestimmung der Lithiumkonzentration kühl gelagert.

#### **3.3.5.2 Paraffineinbettung**

Für die Paraffineinbettung wurden die frisch entnommenen Gewebe über Nacht in Formalin (3,7 %-iges Formaldehyd in PBS) fixiert. Formaldehyd reagiert mit basischen Aminosäuren, wobei es zur Bildung quervernetzender Hydroxymethylgruppen kommt. Somit ist die Permeabilität für Makromoleküle relativ gering und die Struktur zytoplasmatischer Proteine wird kaum verändert. Für die anschließende Entwässerung wurden die Gewebe in 50 %-iges Ethanol gelegt und danach in die Paraffineinbettmaschine (Shandon Hypercenter XP) über Nacht prozessiert. Die Gewebe wurden in vorbereitete Plastikformen die mit flüssigem Paraffin gefüllt waren fixiert und bei Raumtemperatur ausgehärtet.

#### **3.3.5.3 Paraffinschnitte**

Für die Paraffinschnitte wurden die Paraffinblöcke auf dem Mikrotom (Leica RM 2155) befestigt und in einer Dicke von 10 µm geschnitten. Die Schnitte wurden auf einem Wassertropfen auf einem Objektträger übertragen. Zur Streckung der Schnitte wurden die Objektträger auf eine 40°C warme Heizplatte gelegt.

#### **3.3.5.4 Entparaffinierung**

Für die Entparaffinierung wurden die Objektträger 30 Minuten bei 45°C erwärmt und danach sofort 2 Mal 5 Minuten in Xylol gewaschen. Danach wurden die Schnitte jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 75 % Ethanol) rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte 3 Mal mit destilliertem Wasser gewaschen.



### 3.3.5.5 Histologische Färbung (PCNA- und TUNEL-Färbung)

Die Tumorschnitte wurden zur Bestimmung der Apoptoserate mit Hilfe des Apoptag Kits (Chemicon) entsprechenden der Angaben des Herstellers gefärbt.

Für die PCNA-Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und anschließend 10 Minuten in 2 M HCl inkubiert und 4 Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden 20 Minuten in Methanol/0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelegt, 3 Mal mit PBS gewaschen und 15 Minuten mit PBS, das mit 10 % Kaninchenserum versetzt worden war geblockt. Der PCNA-Antikörper wurde in PBS/10 % Kaninchenserum auf einer Endkonzentration von 10 µg /ml verdünnt und die Proben in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Schnitte wurden am nächsten Tag 3 Mal mit PBS gewaschen und 5 Minuten in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS inkubiert. Ein biotinylierter, gegen Maus gerichteter Antikörper wurde 1:400 in PBS/10 % FCS verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 3 Mal mit PBS gewaschen and für 30 Minuten mit einer Strept/ABComplex/HRP-Lösung (DakoCytomation), die laut Herstellervorschrift hergestellt worden war, inkubiert. Die Präparate wurden 3 Mal mit PBS gewaschen, mit AEC-Lösung (Innovative Diagnostis-Systems) 10 Minuten inkubiert und anschließend mit Hämatoxylin gefärbt.

Die PCNA-positiven Zellen wurden auf einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> gezählt.

Für die Bestimmung der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen wurde folgende Formel angewandt:

$$\boxed{\text{Anzahl apoptotische Zellen} \times 0,842 = \text{Anzahl apoptotische Zellen} / \text{mm}^2}$$

$$\text{Bildausschnitt} = 1,18825 \text{ mm}^2$$

$$\text{Faktor für positive Zellen pro mm}^2 = 0,842$$

## 4. Ergebnisse

### 4.1 LiCl unterdrückt die Proliferation der Tumorzellen

Vorangegangene Experimente haben gezeigt, dass die Inhibition von GSK-3 zur Akkumulation und Aktivierung von p53 führt (Kulikov et al., 2005, Turenne et al., 2001), ein Tumorsuppressorprotein das Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren kann. Nach diesen Ergebnissen kann man annehmen, dass die Hemmung der GSK-3 ein wichtiger Schritt in der Tumorthherapie sein könnte. Aus diesem Grund habe ich die Auswirkung der GSK-3-Inhibition auf die Proliferationsrate von Tumorzellen untersucht. Ein wichtiger Punkt ist hierbei ebenfalls die p53-Abhängigkeit zu untersuchen, weil p53 oft Apoptose einleitet. In diesem Experiment bestimmte ich nach Inkubation der Osteosarkomzelllinien U2Os und SaOs-2 mit LiCl beziehungsweise Alsterpaullon, zwei bekannten GSK-3-Inhibitoren, die Veränderung der Zellproliferationsrate bestimmen. Hierfür habe ich ein MTT-Experiment durchgeführt. Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test. Zellen werden *in vitro* mit dem namensgebende Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu messen.

Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Früher wurde angenommen, dass MTT durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen reduziert wird, Untersuchungen in den letzten Jahren legen jedoch nahe, dass die Reduktion hauptsächlich von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH und nur teilweise von Succinat abhängig ist. Die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs entspricht damit der Glykolyserate der Zellen per se und ist somit weniger ein Maß für die Zellatmung. Die Reduktion von MTT durch NADH und NADPH ist abhängig von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums. Die partielle Reduktion von MTT durch Succinat in den Mitochondrien dagegen ist abhängig von dem Enzym Succinat-Dehydrogenase (mitochondrialer Komplex II).

Für diesen Experiment habe ich die zwei Osteosarkomzelllinien mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt vier Tage später mit MTT-Lösung behandelt. Die Extinktion habe ich am ELISA-Messgerät bei 595 nm gemessen.

Abbildung 1 zeigt die Wachstumsrate in unbehandelten und mit LiCl/Alsterpaullon behandelten Zellen. Im oberem Diagramm sieht man die p53-positiven U2Os-Zellen, im unteren Diagramm die p53-negativen SaOs-2-Zellen. Man sieht, dass die Behandlung mit LiCl oder Alsterpaullon einen starken Einfluss auf die Zellproliferation hat: In der Zelllinie U2Os nahm die Proliferation bei den mit LiCl behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 50 % ab, in der Zelllinie SaOs-2 sank das Wachstum bei den mit Alsterpaullon behandelten Zellen ebenfalls 50 %.

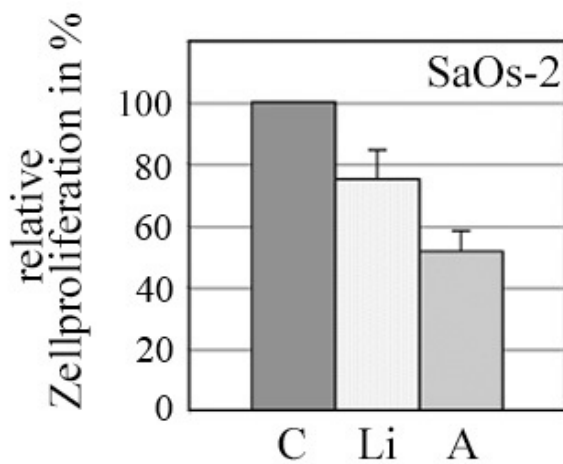
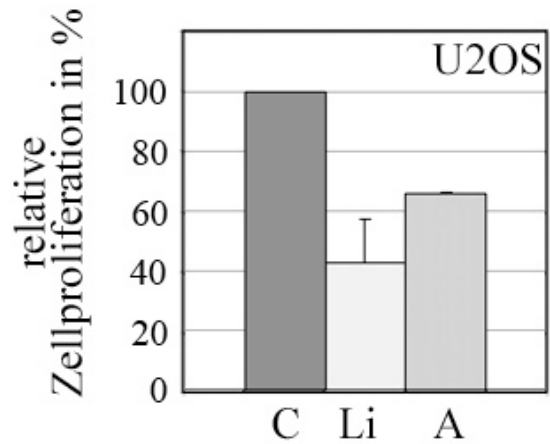


Abbildung 1: GSK-3-Inhibitoren und ihr Einfluss auf die Zellproliferation.  $1 \times 10^5$  U2Os- beziehungsweise SaOs-2-Zellen ausgesät. 24 Stunden später wurden LiCl und Alsterpaullon dazugegeben. Die angewandte LiCl-Konzentration betrug 50 mM. Alsterpaullon wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ M verwendet. 4 Tage nach dem Ausplattieren wurden die Proben für 4 Stunden mit einer MTT-Lösung (1 mg/ml) inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Hier sind die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die relative Zellzahl unbehandelter Proben wurde 100 % gesetzt. (C: Kontrolle, Li: LiCl-Behandlung, A: Alsterpaullon-Behandlung).

## 4.2 LiCl-Behandlung induziert keine Seneszenz in Fibroblastenzellen

In meiner Diplomarbeit habe ich gezeigt, dass die Behandlung der GM1604-Fibroblastenzelllinie mit LiCl beziehungsweise Alsterpaullon eine Abnahme der Proliferation bewirkt. Eine reduzierte Zellzahl konnte ich auch bei der zweiten Fibroblastenzelllinie GM38 feststellen. Bei dieser Zelllinie sind keine Anzeichen von Zelltod aufgetreten.

Um nachzuweisen, ob vitale aber wachstumsarretierte Inhibitor-behandelte Zellen aufgrund von Seneszenzerscheinungen nicht weiter proliferieren, führte ich bei primären GM38-Zellen an unterschiedlichen Tagen eine  $\beta$ -Galaktosidasefärbung durch. Als Seneszenz bezeichnet man die Zellalterung. Differenzierte Zellen teilen sich bereits nach wenigen Passagen nicht mehr (Itahana et al., 2004). Dieses Phänomen ist meistens auf die Telomerverkürzung zurückzuführen (Allsopp et al., 1992, Vaziri et al., 1993). Telomere sind die Endstrukturen eines Chromosoms die chromosomale Fusionen verhindern. Bei jeder DNS-Replikation einer Zellteilung werden 50 bis 200 Basen am 3'-Ende der Telomer-DNS-Sequenz ignoriert und damit das Telomer nach jeder DNS-Replikationsrunde entsprechend verkürzt (Greider, 1990 und 1996, Campisi, 2000, Lundberg, 2000). Dadurch wird an den freien Chromosomenenden über unbekannte Faktoren das Signal der replikativen Seneszenz in den Zellen eingeschaltet (Itahana et al., 2004). Eine Telomer-unabhängige Form der Seneszenz kann durch zellulären Stress wie UV-Strahlung,  $H_2O_2$ , reaktive Sauerstoffspezies oder DNS-Schädigung ausgelöst werden (Serrano et al., 1997, Weinberg, 1997, Chanf et al., 1999, Lundberg et al., 2000, Campisi 2000).

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung beruht auf der Beobachtung, dass Fibroblasten, die sich im Stadium der terminalen Differenzierung befinden, erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität aufweisen (Goberdhan, 1995) Die Expression an  $\beta$ -Galaktosidase wird daher allgemein als Seneszenzmarker benutzt. Durch die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung kann die Expression eines *LacZ*-Gens durch eine Blaufärbung indirekt nachgewiesen werden. Durch die Spaltung von X-Gal durch die  $\beta$ -Galaktosidase entsteht ein blauer Indolfarbstoff der am Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Dadurch läßt sich eine Blaufärbung der terminal differenzierten Zellen feststellen.

In meinem Experiment habe ich die Zellen (GM38 in Passage 12 beziehungsweise Passage 25 als Kontrolle) für 24 und 48 Stunden mit LiCl behandelt. Die Zellen wurden anschließend fixiert und mit 5-Bromo-4 Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -Galaktosid bei pH 6,0 für 18 Stunden inkubiert.

In der Abbildung 2 sind die seneszenten Zellen durch  $\beta$ -Gal blau gefärbt. Außerdem sind sie mit Pfeilen gekennzeichnet. Die linke Spalte zeigt die Fibroblasten in Passage 12 und die rechte Spalte die Passage 25. In der Kontrolle sind keine  $\beta$ -Gal-exprimierenden Zellen zu sehen. Anzeichen einer Zellalterung zeigten nur die Proben in Passage 25 und zwar 24 und 48 Stunden nach LiCl-Gabe. Mit diesem Experiment konnte ich zeigen dass die Behandlung der Fibroblasten mit LiCl keine Seneszenz induziert.

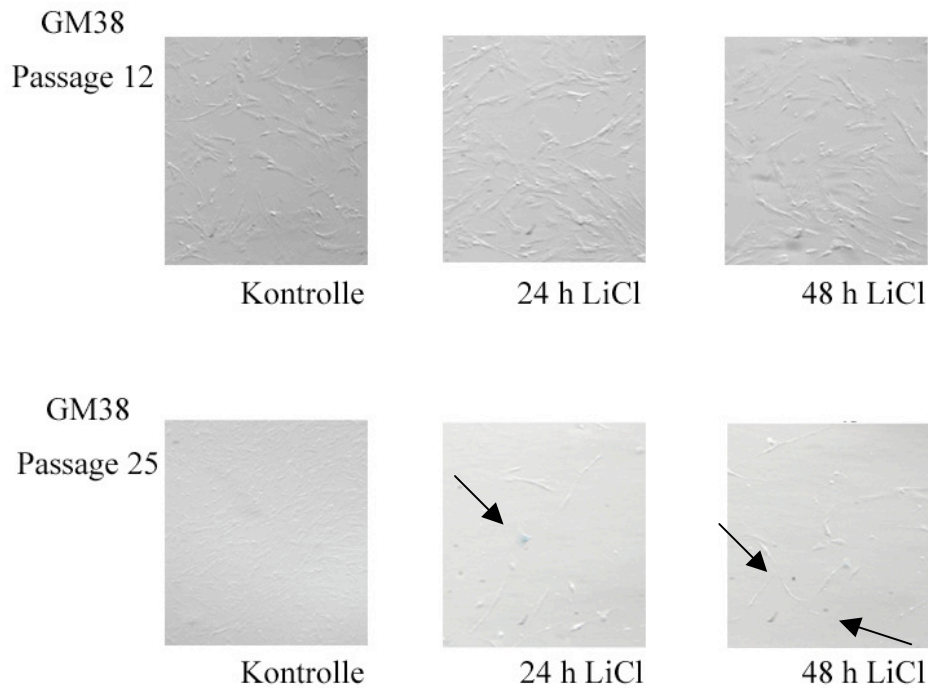


Abbildung 2: LiCl induziert keine Seneszenz in GM38-Fibroblasten der Passage 12. Die Zellen (GM38 Passage 12 und 25) wurden mit einer Konzentration von 50 mM LiCl für die oben angegebenen Zeitpunkte behandelt und mit X-Gal angefärbt. Die  $\beta$ -Gal gefärbten Zellen sind blau gekennzeichnet. Die Pfeile zeigen auf die positiv-seneszenten Zellen hin. Obere Zeile: Passage 12, untere Zeile: Passage 25.

#### 4.3 Nach Inhibition von GSK-3 mit LiCl wird keine Autophagie in Tumorzellen eingeleitet

Die ersten Anzeichen eines Zelltods bei Tumorzellen nach Inhibition der GSK-3 mit LiCl habe ich bereits in der Diplomarbeit durch morphologische Betrachtung und Trypanblaufärbung gezeigt. In der Zelle gibt es mehrere Arten von programmiertem Zelltod: Autophagie, Apoptose und Nekrose. Autophagie ist eine Form des Zelltods die mit starker Vakuolisierung des Zytoplasmas und Zerstörung der zellulären Organisation einhergeht, aber keine Anzeichen von DNS-Fragmentierung oder Caspase-Aktivität zeigt. Um Zelltod durch Autophagie ausschließen zu können, habe ich drei unterschiedliche Tumorzelllinien, HCT116 p53-positive und -negative Zellen und die U2Os-Zellen mit MDC (Mondansylcadaverin) angefärbt (siehe Abbildung 3). MDC ist eine chemische Substanz die die Vakuolen anfärbt und damit die starke Vakuolisierung im Verlauf der Autophagie verdeutlicht. Hierfür wurden die Zellen mit LiCl beziehungsweise Alsterpaullon behandelt, an den entsprechenden Zeitpunkten geerntet und mit MDC angefärbt. Die Färbung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Zeiss Axiovert S100).

Das Ergebnis des Experiments war, dass weder bei den HCT116 (p53+/+), den HCT116 (p53-/-) noch bei den U2Os-Zellen eine Vakuolisierung der Zelle nach GSK-3 Inhibition mit LiCl und Alsterpaullon gefunden wurde.

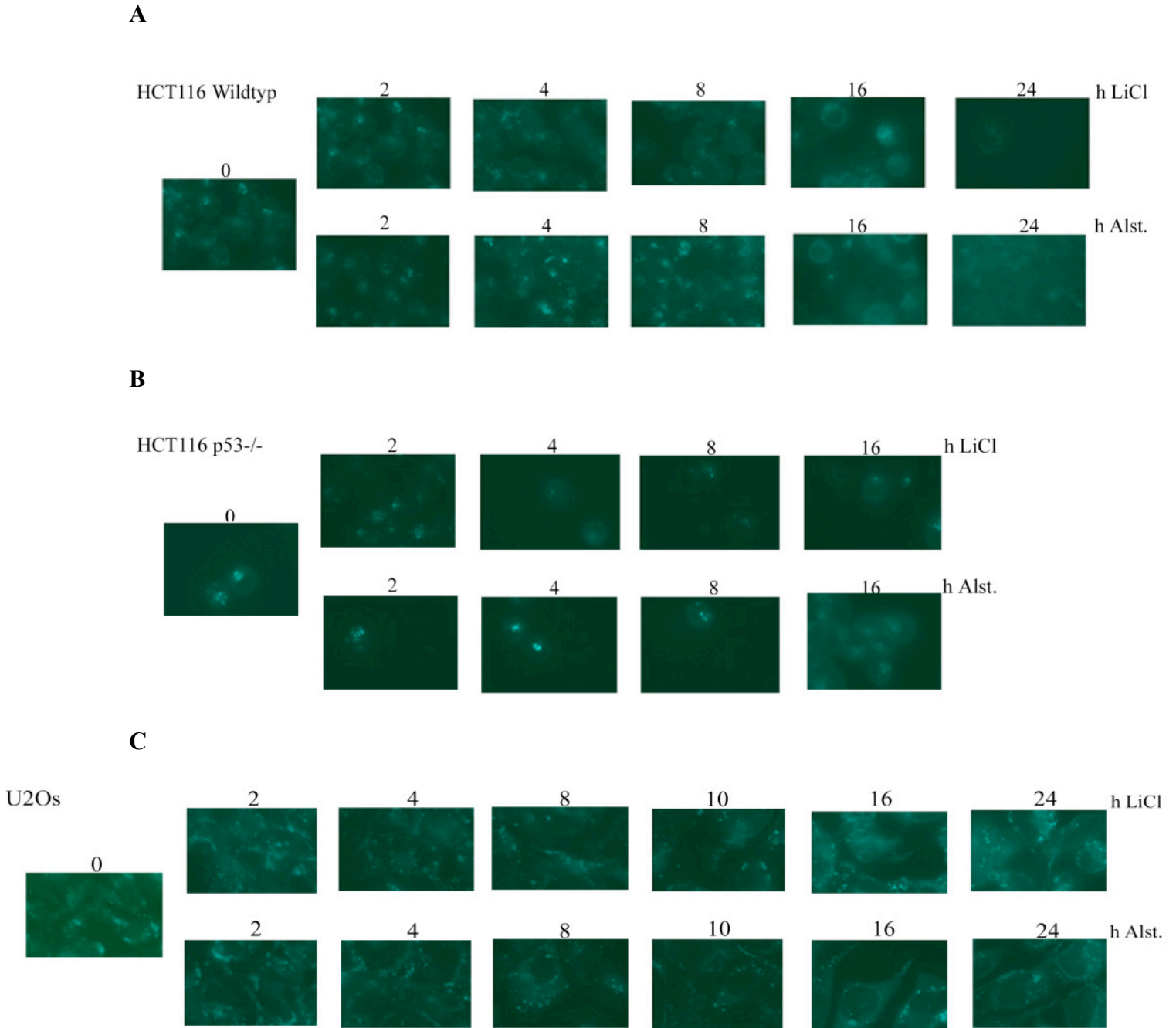


Abbildung 3: GSK-3 Inhibition löst keine Autophagie in den HCT116- und U2Os-Zellen aus. Die Zellen wurden für die Fixierung auf Objektträger auf Glasplättchen angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 50 mM LiCl/5 $\mu$ M Alsterpaullon (A) zu den entsprechenden Zeitpunkten behandelt und mit MDC angefärbt. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert (72X-Vergrößerung).

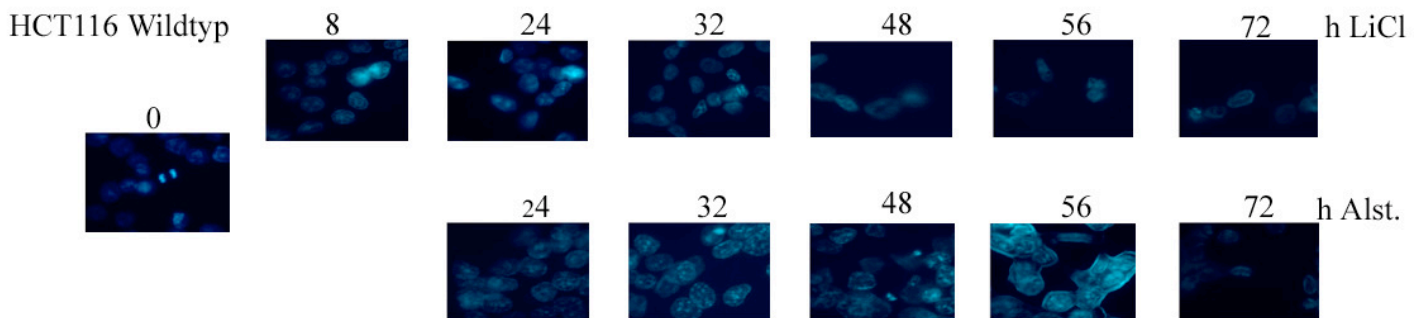
#### 4.4 Die Inhibition von GSK-3 löst Apoptose in HCT116-Tumorzellen aus

Eine der Hauptarten des programmierten Zelltods ist die Apoptose, ein Vorgang der durch Membranblebbing, Spaltung von Caspase-3 beziehungsweise PARP und DNS-Fragmentierung charakterisiert ist. Um zu überprüfen, ob in Tumorzellen nach LiCl-Behandlung Apoptose eintritt, habe ich HCT116-Kolonkarzinomzellen auf Fragmentierung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) hin untersucht. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNS einlagert. Bei Anregung mit einer Wellenlänge von 350 nm emittiert er Licht im Bereich um 460 nm. DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNS aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen. Der Vorteil dabei ist, dass eine zytoplasmatische Färbung nicht nachweisbar ist.

Die Zellen wurden mit LiCl und Alsterpaullon behandelt, an den entsprechenden Zeitpunkten geerntet und mit DAPI im Dunkeln gefärbt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte an einem Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop.

Abbildung 4 A und B zeigen Zellkerne von LiCl- beziehungsweise Alsterpaullon-behandelten HCT116-Zellen (p53-positiv und -negativ) nach verschiedenen Inkubationszeiten. Man sieht, dass beide GSK-3-Inhibitoren eine Abnahme der Zellzahl induzierten. Bereits 24 Stunden nach Behandlung begann die DNS fragmentiert zu werden, was im entsprechenden Bild als leuchtende Punkte erscheint. Nach 3 Tagen war der Großteil der HCT116-Wildtyp-Zellen gestorben. Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl der Zellen, in denen p53 deletiert war, zwar auch ab, aber nach 72 Stunden waren immer noch Zellen vorhanden. In den Abbildungen erkennt man, dass Alsterpaullon eine weniger starke Abnahme der beiden HCT116-Zelltypen bewirkt:

A



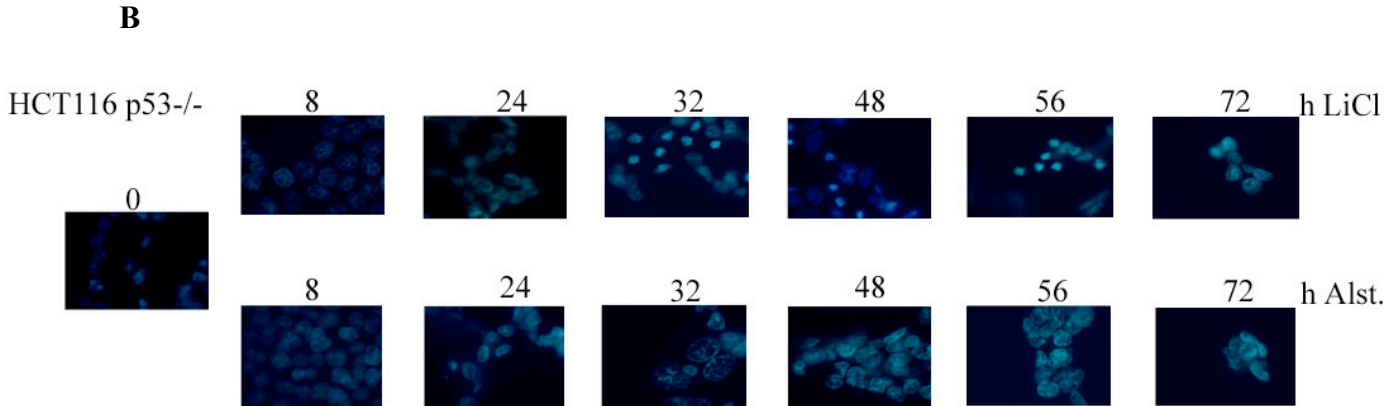


Abbildung 4: DAPI-Färbung der HCT116-Kolonkarzinomzellen (A: p53-positiv, B: p53-negativ). Die Zellen wurden für die Betrachtung am Mikroskop auf Glasplättchen gezogen, nach 24 Stunden mit LiCl (50 mM) und Alsterpaullon (Alst., 5  $\mu$ M) behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurden sie mit einem Azeton:Methanol-Gemisch für 5 Minuten auf Eis fixiert und mit DAPI 30 Minuten im Dunkeln gefärbt. Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (42X-Vergrößerung).

Apoptotische Zellen können zwei Wege zur DNS-Fragmentierung einschlagen: Einen Caspase-abhängigen und einen -unabhängigen. Der gängigste Weg ist der durch Caspasen eingeleitete programmierte Zelltod. Hierbei spielt die Caspase-3 eine gewichtige Rolle, da sie unter anderem PARP spaltet. PARP ist ein kernständiges 116 kDa-Enzym, das an DNS-Strangbrüche bindet und dadurch enzymatisch aktiv wird. Es überträgt vom Substrat  $\text{NAD}^+$  die ADP-Ribose auf Kernproteine. PARP wird während der Apoptose durch Caspase-3 in zwei Fragmente (86 und 29 kDa) spezifisch gespalten. Im Zentrum des apoptotischen Programms in Säugerzellen steht die Aktivierung dieser Caspasen. Diese Proteasen sind sowohl an der Regulation als auch an der Ausführung des Zelltods beteiligt. In Zytoplasma liegen sie fertig synthetisiert in einer inaktiven Form vor. Das inaktive Protein kann in drei Abschnitte unterteilt werden: Eine regulatorische Prodomäne, der eine lange und eine kurze Untereinheit folgen. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Untereinheiten und der nachfolgenden Abspaltung der Prodomäne. Im Regelfall erfolgen Spaltung und Aktivierung durch Caspasen selbst. Zur Bildung der aktiven Form einer Caspase lagern sich schließlich je zwei kurze und zwei lange Untereinheiten zu einem Tetramer zusammen. Speziell die Caspase-3 wird aus einer 35 kDa-Form in ein 19 kDa- und ein 17 kDa-Stück gespalten. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit LiCl zum Caspase-abhängigen Weg führt, habe ich in p53-positiven und -negativen HCT116-Zellen nach den zwei aktiven Spaltprodukten der Caspase-3 gesucht. Dies geschah durch Antikörperdetektion. Die Spaltung der Caspase-3 konnte ich in den p53-positiven Zellen innerhalb von 24 Stunden nach LiCl-Zugabe beobachten (Abbildung 5A). 48 Stunden nach Behandlung konnte ich sowohl eine Abnahme des ungespaltenen 35 kDa Fragmentes als auch eine niedrigere Menge des Ladekontrolleproteins Tubulin erkennen. Bei den Zellen, die eine genetische p53-Deletion besitzen, wurde die Caspase-3-Spaltung erst nach einer sehr langen Exposition der Membran sichtbar, siehe Abbildung 5B rechts.



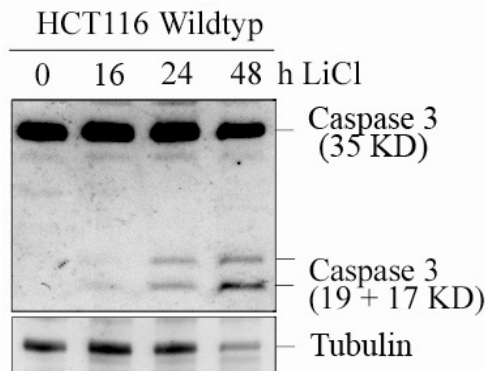
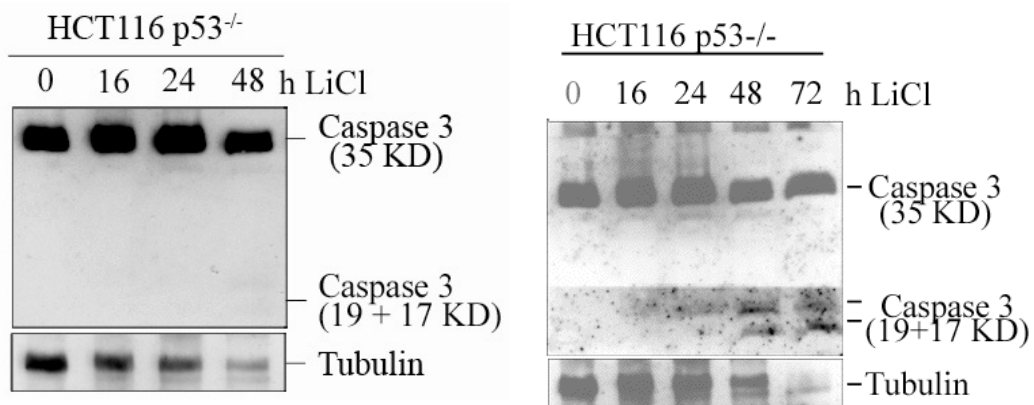
**A****B**

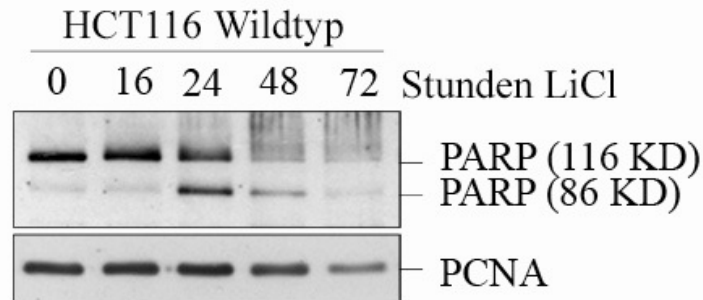
Abbildung 5: LiCl induziert Caspase-3-Aktivierung in p53-positive und -negative Kolonkarzinomzellen. HCT116-Wildtyp- und HCT116-p53<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit 50 mM LiCl inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Zellysate wurden mittels NP-40 Lysispuffer hergestellt und 50 µg Protein wurden auf ein 15 % SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem Caspase 3- und Tubulin-Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. Der rechte Teil der Abbildung B zeigt eine längere Exposition der Membran (30 Minuten).

Der DNS-Fragmentierungsprozess wird auch dadurch unterstützt, dass Caspasen ebenfalls DNS-Reparaturenzyme spalten und somit inaktivieren. Hier sei vor allem das eukaryotische DNS-Bindungsprotein PARP erwähnt, welches der Gewährleistung der DNS-Reparatur und -Stabilität dient.

Nachdem dieser Teil des Caspase-abhängigen Signalweges zur Apoptose von mir in HCT116-Zellen nachgewiesen war, wendete ich mich der Untersuchung des Caspase-3-Substrates PARP zu. Wie bereits oben erwähnt, wird es während der Apoptose durch Spaltung in zwei kleinere Fragmente (86 und 24 kDa) inaktiviert. Seinen Nachweis geschah durch Antikörperdetektion. Sowohl das ungespaltene aktive PARP, als auch das größere der beiden inaktiven Fragmente konnte in beiden HCT116-Zelltypen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6 A und B). Die 86 kDa-Bande zeigte sich in den p53<sup>+/+</sup>-Zellen 24 Stunden nach LiCl-Zugabe und nahm nach 48 Stunden wieder ab. Auch das ungespaltene Protein nahm nach 48 h ab, sowie die Ladekontrolle PCNA (Abbildung 6 A). In den p53-negativen Zellen nahm das ungespaltene PARP ebenfalls nach 24 Stunden ab. Das 86 kDa-Fragment war nach 72 Stunden nicht mehr detektierbar

und zeigte im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen keine Zunahme nach LiCl-Gabe (Abbildung 6 B).

**A**



**B**

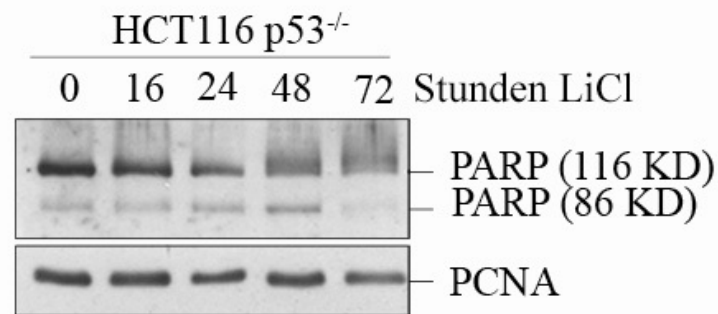


Abbildung 6: LiCl induziert PARP-Spaltung in p53-positiven und -negativen HCT116-Kolonkarzinomzellen. HCT116-Zellen (**A**: p53-positiv, **B**: p53-negativ) wurden mit 50 mM LiCl behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Zellysate wurden mittels NP-40 Lysispuffer hergestellt und 50 µg Protein wurden auf einem 10 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und mit PARP-Antikörper beziehungsweise PCNA-Antikörper als Ladekontrolle inkubiert.

Nachdem die Zelle das Signal bekommen hat in Apoptose zu gehen, wird die DNS durch Nukleasen in kleine Fragmente gespalten wobei eine so genannte DNS-Leiter entsteht. Das kleinstmögliche Fragment ist 146 Basenpaare groß. Diese DNS-Leiter ist im Agarosegel leicht zu detektieren, weil die kleinen Fragmente im Gel weiter als die großen Fragmente laufen.

Die beiden HCT116-Zellen wurden angesetzt, mit 50 mM LiCl behandelt und an den entsprechenden Zeitpunkte geerntet. Nach der Lyse und Fällung der apoptotischen DNS, wurden die DNS-Fragmente in einem 1,4 %-igem Agarosegel sichtbar gemacht.

Ähnlich wie die PARP- und Caspase-3-Spaltung haben in diesem Fall die p53-positiven Zellen ebenso eine DNS-Fragmentierung gezeigt aber verspätet (Abbildung 7). Die ersten Anzeichen dieses Merkmals waren schon 16 Stunden nach LiCl-Zugabe aufgetreten und haben sich in den folgenden 8 Stunden weiterhin gesteigert. Die HCT116-Zellen mit dem deletierten p53 haben 48 Stunden nach der Behandlung mit dem LiCl-Inhibitor nur eine leichte Fragmentierung der DNS gezeigt.

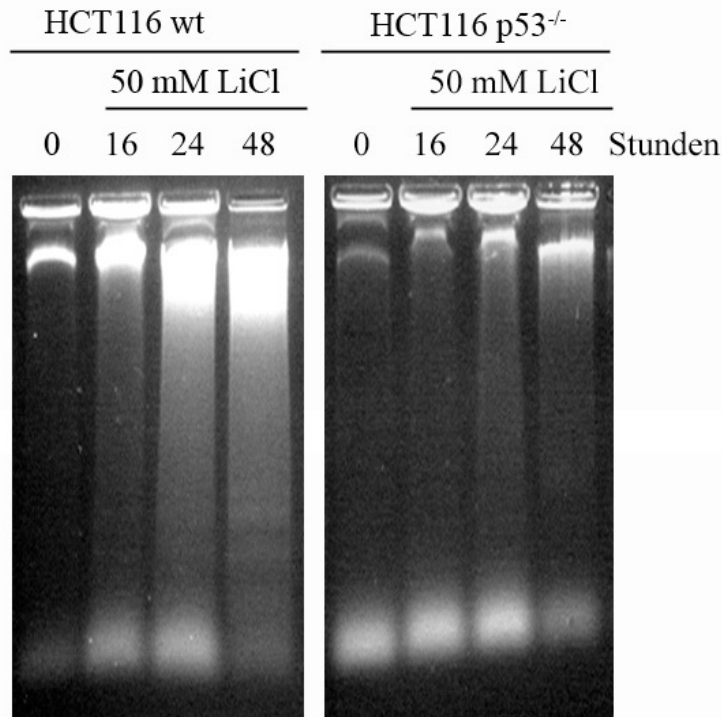


Abbildung 7: HCT116-Kolonkarzinomzellen zeigen eine DNS-Fragmentierung nach LiCl-Zugabe. HCT116-Wildtyp und HCT116-p53-Zellen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten mit 50 mM LiCl behandelt. Die apoptotische DNS wurde isoliert und auf einem 1,4 %igem Agarosegel aufgetrennt. Linkes Bild zeigt HCT116-Wildtypzellen und des rechte Bild die p53-negativen HCT116-Kolonkarzinomzellen.

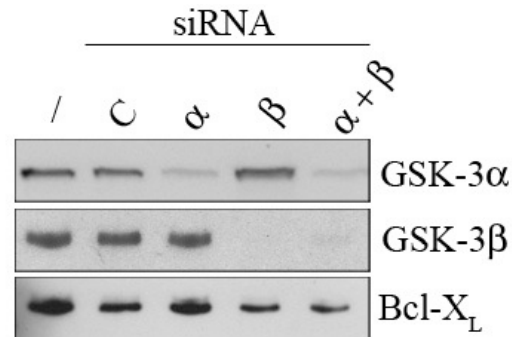
Eine sehr große Beeinträchtigung in der Anwendbarkeit der Kinaseinhibitoren ist ihre mangelnde Spezifität. Eine sehr wichtige Frage war also, ob die Einleitung der Apoptose durch LiCl/Alsterpaullon auf die Inhibition von GSK-3 zurückzuführen ist, oder ob der Zelltod als Folge der mangelnden Spezifität der GSK-3-Inhibitoren ausgelöst worden war. Um dieses Problem anzugehen, habe ich die zwei GSK-3-Isoformen (GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ ) in Osteosarkomzellen (U2Os) durch siRNA ausgeschaltet und anschließend die Caspase-3-Aktivität als Marker für die Induktion des Zelltodes gemessen. Die siRNA-Methode nutzt einen in jeder Zelle ablaufenden Mechanismus, der ein Genregulationssystem und gleichzeitig einen Abwehrmechanismus darstellt. Die Zelle reagiert auf doppelsträngige RNS-Moleküle mit der sofortigen Zerstörung desselben. Das transfizierte RNS-Molekül lagert sich an die passende mRNA an und löst damit deren Abbau aus. Das Protein, für das die Nukleinsäure kodiert, kann nicht entstehen.

Für dieses Experiment habe ich U2Os-Zellen angesetzt, mit den entsprechenden siRNA-Moleküle gegen den zwei Isoformen der GSK-3 beziehungsweise einer Kontroll-siRNA zur Kontrolle transfiziert und 3 Tage später geerntet. Mit ein Aliquot der Zellen habe ich eine Westernblotanalyse zur Überprüfung der Ausschaltung der zwei Gene durchgeführt und die restlichen Zellen habe ich das Caspase-3 Aktivitätstest mit Hilfe des Kits der Firma Clontech gemessen.

Wie in Abbildung 8 A sichtbar, haben die zwei siRNAs die gegen die beiden Isoformen von GSK-3 gerichtet waren, die GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  in gleichem Maß erfolgreich

ausgeschaltet. Eine Kombination der zwei siRNAs hat beide Isoformen beeinträchtigt. Eine unbehandelte und eine mit Kontroll-siRNA behandelte Probe haben die Proteinmenge der zwei Isoformen nicht verändert. Gleichzeitig war die Caspase-3-Aktivität deutlich angestiegen (Abbildung 8 B). Durch das Ausschalten der GSK-3 $\alpha$ -Isoform wurde eine höhere Caspase-3-Aktivität erreicht, als durch die Anwendung der siRNA gegen die GSK-3 $\beta$ -Form und die zwei siRNAs zusammen waren sogar noch effizienter in der Aktivierung der Caspase-3. Die Transfektion der Kontroll-siRNA hat eine nur leicht erhöhte Caspase-3-Aktivität gezeigt.

**A**



**B**

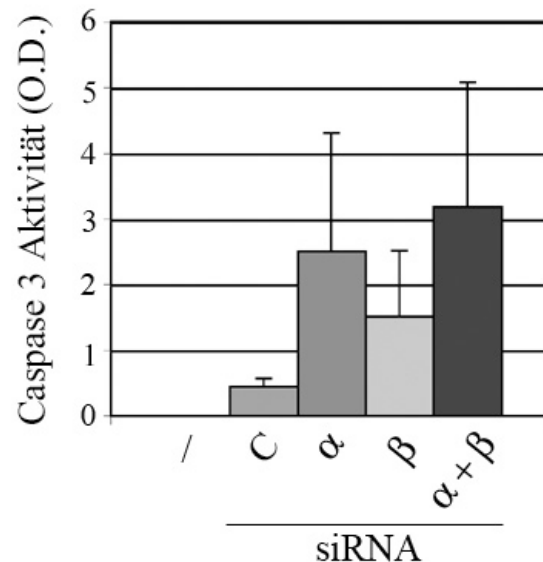


Abbildung 8: Das Ausschalten der GSK-3 mittels siRNA führt zu erhöhter Caspase-3-Aktivität.

**A:** U2Os-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA, GSK-3 $\alpha$ -siRNA, GSK-3 $\beta$ -siRNA und einem Gemisch aus den beiden siRNAs transfiziert (je 20 pmol in 50  $\mu$ l DMEM verdünnt). 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Proben geerntet, Zelllysate mittels NP-40 Lysispuffer hergestellt und 50  $\mu$ g Protein in einem 12 %-SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und mit Antikörpern gegen GSK-3 $\alpha$  beziehungsweise GSK-3 $\beta$  und Bcl-X<sub>L</sub> als Ladekontrolle inkubiert.

**B:** Mit einem Aliquot der Zellen wurde die Caspase-3-Aktivität am ELISA-Messgerät bestimmt (Kit der Firma Clontech, USA). Das Stabdiagramm zeigt Mittelwerte und Fehlerbalken von zwei unabhängigen Experimenten (C: Kontroll-siRNA,  $\alpha$ : GSK-3 $\alpha$ -siRNA,  $\beta$ : GSK-3 $\beta$ -siRNA,  $\alpha+\beta$ : GSK-3 $\alpha$ /GSK-3 $\beta$  siRNA).

#### 4.5 LiCl-induzierter Zelltod ist in HCT116-Zellen p53-unabhängig

Weil die Inhibition von GSK-3 eine Zunahme der Menge und somit Aktivität von p53-Protein erzeugt, wollte ich überprüfen ob p53 auch eine Rolle bei der Induktion des Zelltodes nach GSK-3 Inhibition spielt. Hierfür habe ich die p53-positive und -negative Zelllinie HCT116 auf ihre Fähigkeit nach Zugabe von LiCl Kolonien zu bilden analysiert. Dieses erste Kolonieexperiment wurde mit drei unterschiedlichen LiCl-Konzentrationen (10 mM, 20 mM, 50 mM) durchgeführt. Nach 14 Tagen wurden die mit Kristallviolett angefärbten Kolonien gezählt und statistisch ausgewertet.

Da ich bereits bei einer Konzentration von 10 mM LiCl eine drastische Abnahme (fast 80 %) in der Anzahl der Kolonien beobachten konnte, habe ich dasselbe Experiment mit Konzentrationen unter 10 mM LiCl (1, 2, 3, 4 und 7 mM) durchgeführt.

Die Ergebnisse der p53-positiven HCT116-Kolonkarzinomzellen sind in Abbildung 9 zu sehen. Das obere Stabdiagramm zeigt die bereits erwähnte extreme Reduktion der Kolonienanzahl bei einer Konzentration von 10 mM LiCl. Bei 20 und 50 mM LiCl waren nach 2 Wochen gar keine Kolonien mehr sichtbar. Das untere Stabdiagramm zeigt die Konzentration bis 7 mM LiCl. Man sieht eine stetige Abnahme der Kolonien.

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der p53-/- HCT116-Zellen. Hier ist im oberen Diagramm eine Abnahme der Kolonienzahl bei Behandlung mit 10 mM LiCl im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Im unteren Teil dieser Abbildung weisen die Kolonienanzahlen bis 7 mM LiCl eine stetige Abnahme auf.

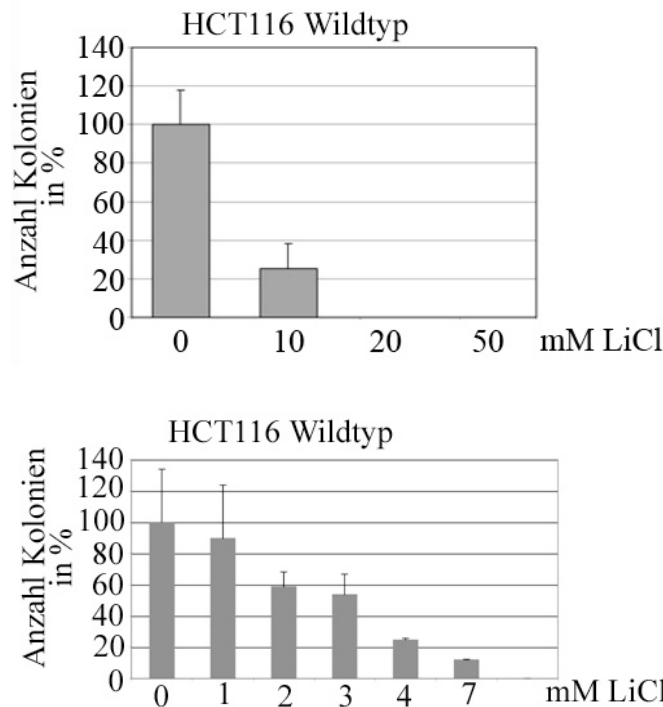


Abbildung 9: Einfluß von verschiedenen LiCl-Konzentrationen auf die Kolonienanzahl der p53-positiven HCT116-Kolonkarzinomzellen. 200 p53-positive (Wildtyp) HCT116 -Zellen wurden angesetzt. LiCl wurde in den angegebenen Konzentrationen nach 24 Stunden hinzugefügt. Zwei Wochen nach dem Ausplattieren wurden die Kolonien mit Kristallviolett gefärbt und gezählt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Die unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt.

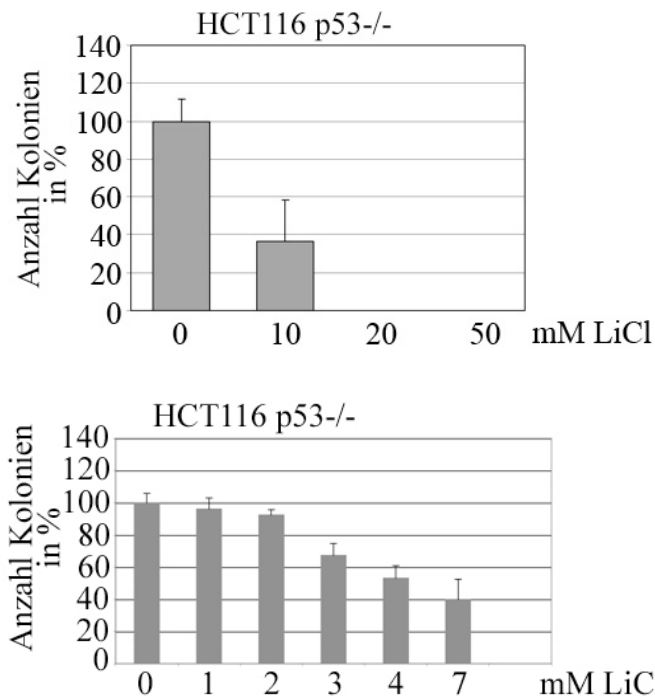


Abbildung 10: Einfluß von verschiedenen LiCl-Konzentrationen auf die Kolonienanzahl der p53-negativen HCT116-Kolonkarzinomzellen. 200 p53-negativen HCT116-Zellen wurden angesetzt. LiCl wurde in den angegebenen Konzentrationen nach 24 Stunden hinzugefügt. Zwei Wochen nach dem Ausplattieren wurden die Kolonien mit Kristallviolett gefärbt und gezählt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Die unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt.

Mit denselben zwei Zelllinien habe ich zusätzlich eine FACS-Analyse (“fluorescence activated cell sorting“) durchgeführt. Im Durchflusszytometer wird die Fluoreszenz von Partikeln gemessen, während diese von einem Laser bestrahlt durch ein Glasröhrchen fließen. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, die an spezifische Substrate binden, können Rückschlüsse auf Veränderungen einzelner Zellzyklusphasen oder auf die Auslösung von Apoptose gezogen werden.

Um die genaue Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen untersuchen zu können, habe ich die HCT116-Zellen (HCT Wildtyp und p53-/-) mit Draq5<sup>TM</sup> gefärbt, was eine hohe Affinität zur DNS hat. Die Sub-G1-Phase zeigt hierbei den Grad der Apoptose an. Hierzu habe ich die zwei Zelllinien angesetzt, mit LiCl behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Die Zellen wurden in 70 %-igem Ethanol über Nacht fixiert und am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzfarbstoff Draq5<sup>TM</sup> gefärbt.

Das Ergebnis der FACS-Analyse war, dass sowohl die p53-positiven als auch die p53-negativen Zellen 8 Stunden nach der LiCl-Behandlung einen erhöhten sub-G1-Punkt gezeigt haben, der anschließend abnahm. 16 h nach LiCl-Zugabe habe ich einen starken Anstieg in der Anzahl der Zellen, die in der G2-Phase des Zellzyklus waren, messen können. Obwohl die p53-positiven und -negativen HCT116-Zellen eine ähnliche Reaktion auf LiCl gezeigt haben, haben die p53-Wildtypzellen eine leicht erhöhte Sterberate im Vergleich zu den p53-negativen Proben gezeigt. Im Gegensatz dazu konnte

ich bei den p53<sup>-/-</sup>-Zellen eine leicht erhöhte Anzahl an Zellen in der G2-Phase beobachten (Abbildung 11).

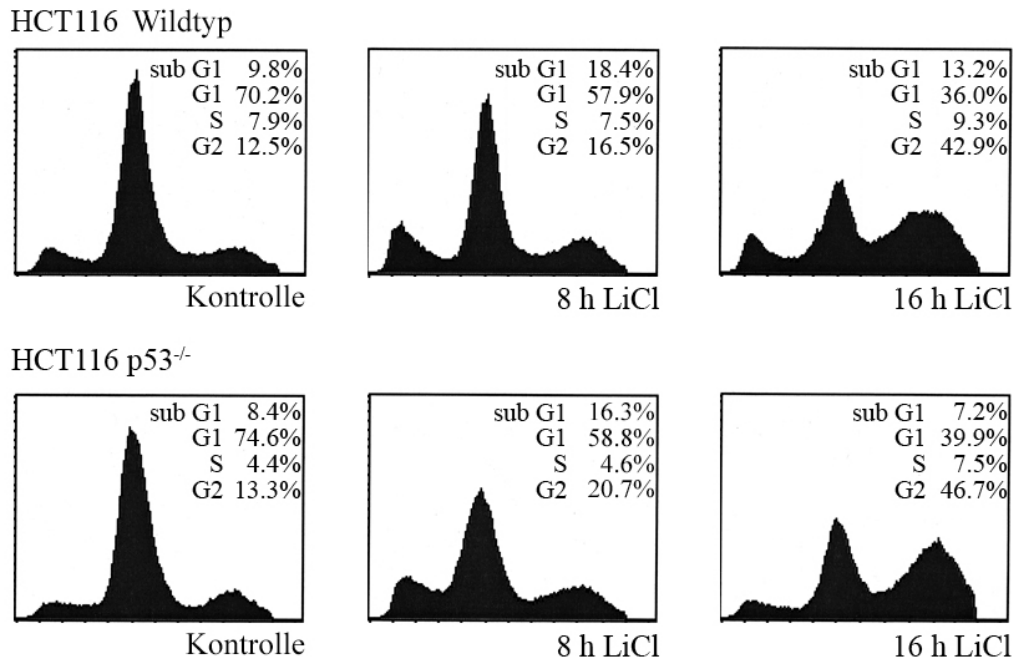


Abbildung 11: p53-unabhängiger Zelltod der HCT116-Tumorzellen nach LiCl-Behandlung. p53-positive und -negative HCT116-Zellen werden mit 50 mM LiCl behandelt. Die Proben wurden nach 8 und 16 Stunden mit 70 %-igem Ethanol fixiert, mit Draq5<sup>TM</sup> gefärbt und am FACS-Gerät gemessen.

#### 4.6 LiCl löst Apoptose in HCT116-Kolonkarzinomzellen über den extrinsischen Weg aus und nicht über den intrinsischen

Apoptose kann über zwei bisher bekannte Signalwege vermittelt werden: Den extrinsischen oder Todesrezeptorvermittelten Weg und den intrinsischen, mitochondrialen Weg.

Der intrinsische Apoptoseweg wird unter anderem durch DNS-Schäden in der Zelle ausgelöst. Cytochrom c und Desoxyadenosintriphosphat (dATP) führen zu einer Konformationsänderung des Proteins Apaf-1, so dass dieses einen hochmolekularen Komplex bildet, das Apoptosom.

In meiner Arbeit habe ich zuerst untersucht, ob LiCl Apoptose über den intrinsischen Weg auslöst. Ich habe hier zunächst die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma untersucht.

Dazu habe ich bei HCT116-Wildtyp-Kolonkarzinomzellen sowie HCT116-Zellen mit genetisch entferntem p53-Gen (p53<sup>-/-</sup>) Zellen mit LiCl behandelt und an den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Anschließend habe ich die Mitochondrien vom Zytoplasma getrennt und die Freisetzung des Cytochrom c verfolgt. Als Positivkontrolle habe ich Jurkat-Zellen für 6 Stunden mit 50 µM Etoposid behandelt. Etoposid ist ein Glykosid-Derivat des Podophyllotoxins, das aus der Wurzel des immergrünen amerikanischen Maiapfels (*Podophyllum peltatum*) gewonnen wird und als Zytostatikum

in der Chemotherapie verwendet wird. Es hemmt das Enzym Topoisomerase II und unterdrückt die Zytokinese. Dies führt dazu, dass die Zelle in das Stadium der Apoptose gelangt und abstirbt.

Von Jurkat-Zellen ist bekannt, dass sie nach 6-stündiger Behandlung mit 50  $\mu$ M Etoposid Apoptose über den intrinsischen Weg einleiten. Mit meinem Experiment konnte ich dieses Ergebnis bestätigen (siehe Abbildung 12 C). In der zytosolischen Fraktion der Jurkat-Zellen stieg die Menge an Cytochrom c in den mit Etoposid (6 Stunden Behandlungsdauer) behandelten Zellen an. Die Kolonkarzinomzellen (p53<sup>+/+</sup> und p53<sup>-/-</sup>) haben im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen keine Anzeichen einer Freisetzung des Cytochrom c aus Mitochondrien ins Zytoplasma nach LiCl-Zugabe gezeigt. Ihr Zytoplasma enthält eine relativ große Menge an Cytochrom c, die aber nach Behandlung mit LiCl konstant hoch bleibt. Einen Unterschied zwischen den p53-positiven und den p53-defizienten Zellen war nicht zu sehen (Abbildung 12 A und B).

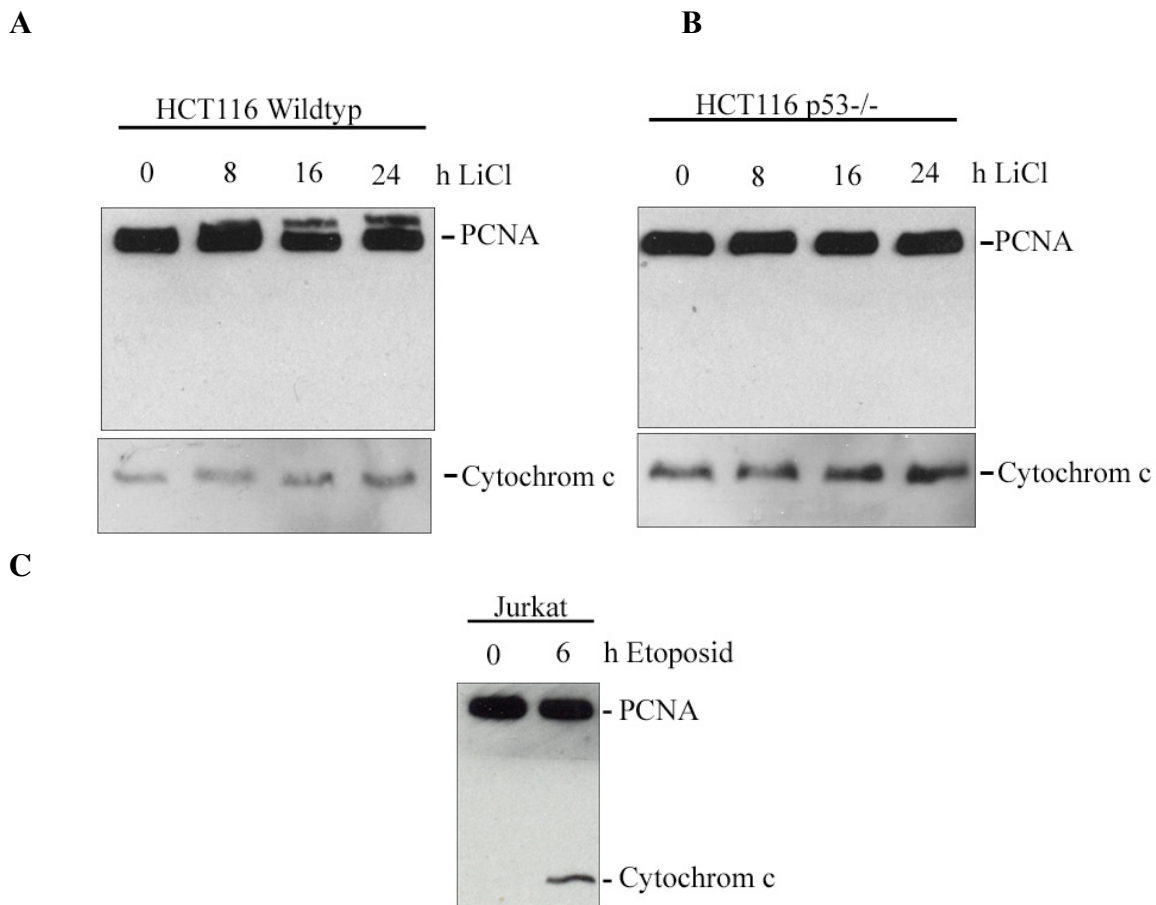


Abbildung 12: LiCl-Behandlung der HCT116-Zellen (**A**: p53-positiv, **B**: p53-negativ) löst keine Apoptose über den intrinsischen Weg aus.

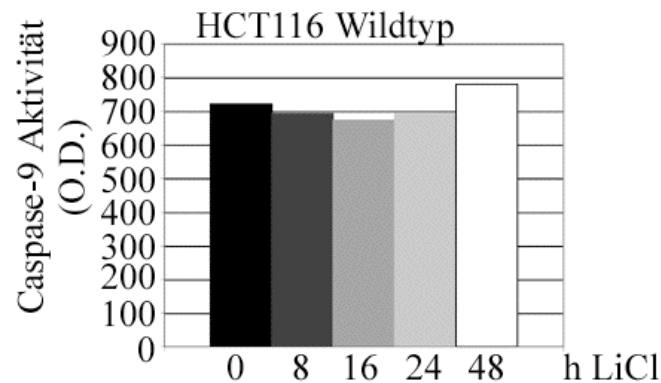
Jurkat-Zellen (**C**:) wurden mit 50  $\mu$ M Etoposid für 6 Stunden behandelt. Zu HCT116-Zellen (p53-positiv und -negativ) wurden 50 mM LiCl gegeben. Mitochondriale und zytosolische Fraktionen wurden durch zwei-stufige Zentrifugation getrennt. Zelllysate von beiden Zelllinien wurden mittels Lasispuffer hergestellt und 50  $\mu$ g Protein der zytosolischen Fraktion wurde in einem 15 %-SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran überführt und mit Antikörpern gegen Cytochrom c und PCNA als Ladekontrolle inkubiert.



Um den intrinsischen Weg komplett ausschließen zu können, habe ich zusätzlich die Aktivität der Caspase-9 gemessen. Caspase-9 ist eine Initiatorcaspase, die im mitochondrialen Signalweg der Apoptose eine Rolle spielt. Die Cytochrom c-Freisetzung aktiviert das Apoptosom: Das Apoptosom ist ein Komplex das aus Cytochrom c, Apaf-1 und ATP zusammengesetzt ist. Nach seiner Bildung wird Caspase-9 an das Apoptosom rekrutiert und aktiviert. Caspase-9 schneidet anschließend die Effektorprocaspasen-3 und -7.

HCT116-Kolonkarzinomzellen (p53-positiv und -negativ) wurden mit LiCl behandelt und nach 8, 16, 24 und 48 Stunden geerntet. Die Caspase-9-Aktivität wurde mit einem Kit der Firma Clontech (USA) am ELISA-Gerät gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 A und B gezeigt. Eine erhöhte Caspase-9-Aktivität war in den p53-positiven Zellen (Abbildung 13 A) nach LiCl-Gabe nicht zu sehen. Die Werte der mit LiCl-behandelten Zellen liegen im Bereich der Kontrollwerte. Die p53-negativen HCT116-Zellen zeigen ein ähnliches Muster, 24 Stunden ist die Caspase-9-Aktivität leicht erhöht aber nicht wesentlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

A



B

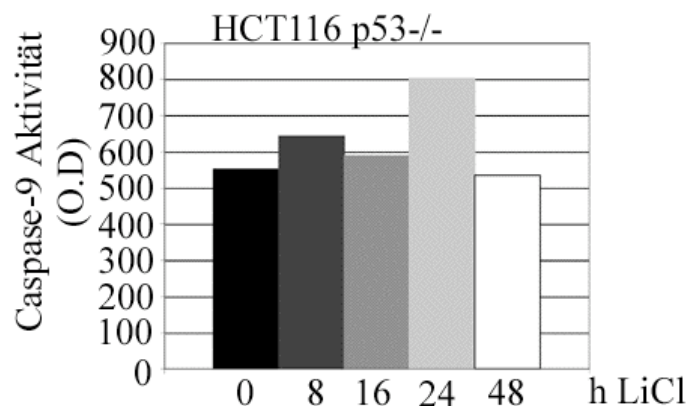


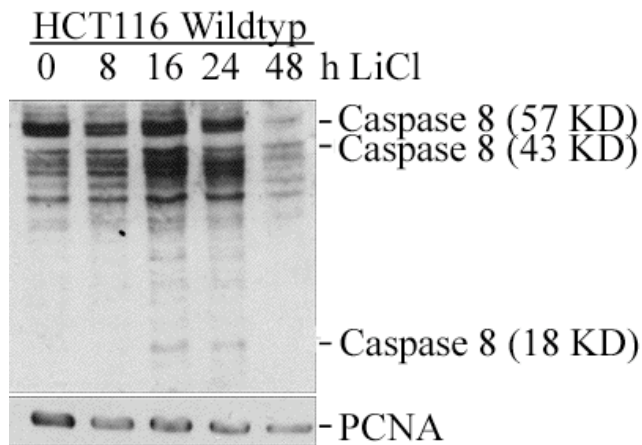
Abbildung 13: Die Caspase-9-Aktivität verändert sich in Folge der LiCl-Behandlung nicht. Das Experiment wurde nach den Vorgaben und mit dem Kit der Firma Clontech (USA) durchgeführt. Standardabweichungen sind nicht vorhanden, weil das Experiment nur ein Mal ausgeführt wurde.

Bei der Rezeptorvermittelten Apoptose wird Caspase-8 als Initiatorcaspase aktiviert. Caspase-8 hat im inaktiven Zustand ein Molekulargewicht von 57 kDa. Wenn es aktiviert ist, wird es in zwei kleinere Fragmente von 43 und 18 kDa gespalten. Ich habe die Zelllinie HCT116 (p53-positiv und -negativ) mit 50 mM LiCl für 8, 16, 24 und 48 Stunden behandelt, um die Aktivierung der Caspase-8 untersuchen zu können. Dies geschah über Westernblot-Analyse und Antikörperdetektion.

Wie in Abbildung 14 A gezeigt, wurde bei den HCT-Wildtyp-Zellen die Caspase-8 16 Stunden nach LiCl-Behandlung in die zwei kleineren Fragmente gespalten (siehe 43 und 18 kDa). Die Menge der Spaltprodukte ließ anschliessend nach. Nach 48 Stunden waren sowohl die Fragmente als auch seine ungespaltene Form nicht mehr detektierbar.

In der Abbildung 14 B sind die p53-deletierten HCT116-Zellen dargestellt. Sie zeigten ebenfalls eine Spaltung der Caspase-8 nach 16 stündiger LiCl-Behandlung. Das 18 kDa-Fragment war nicht zu sehen. Wie bei den p53-positiven Zellen nahmen die Mengen des 43 kDa-Fragments und des ungespaltenen Proteins ab.

A



B

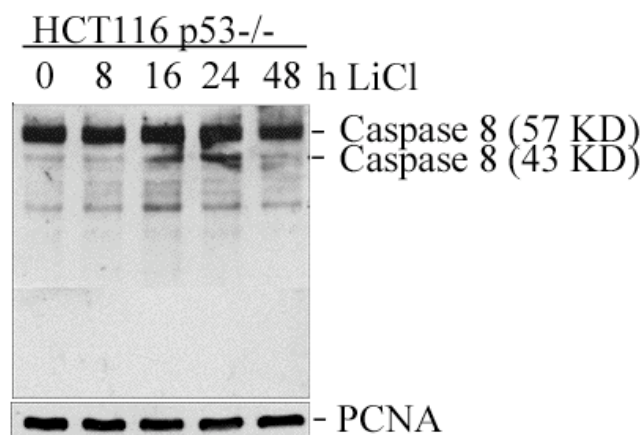


Abbildung 14: LiCl führt zur Aktivierung von Caspase-8 in HCT116-Zellen. p53-positive (A:) und -negative (B:).

HCT116-Kolonkarzinomzellen wurden mittels NP-40-Lysispuffere mit 50 mM LiCl behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Zelllysate wurden hergestellt und 50 µg Protein wurden auf einem

12 %-SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und mit Antikörpern gegen Caspase-8 und PCNA als Ladekontrolle nachgewiesen.

#### 4.7 LiCl induziert Apoptose in MT450-Mammakarzinomzellen (Ratte)

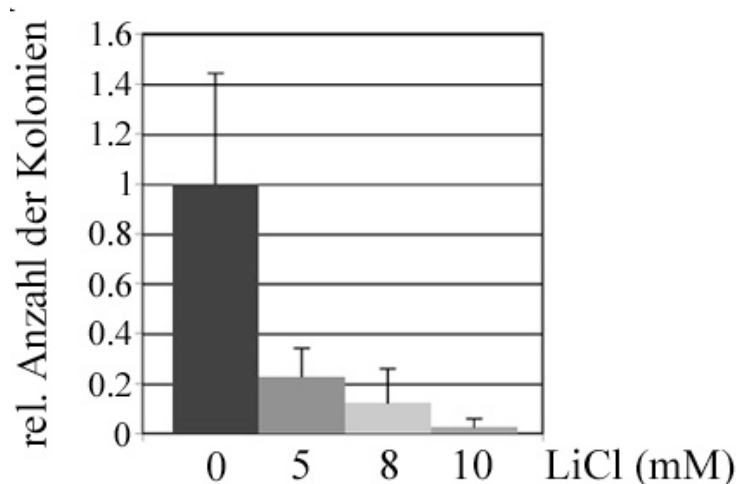
Die Inhibition von GSK-3 und die Auslösung von Apoptose eröffnen die Möglichkeit den Zelltod in Tumorzellen auf einem nicht-genotoxischem Wege auszulösen. Dementsprechend stellte sich die Frage, ob LiCl die Tumorgroße *in vivo* reduzieren kann. Um diese Fragestellung beantworten zu können, habe ich das syngene Rattenmammakarzinom-Tumormodell MT450 gewählt (Krishnan et al., 2003).

Um die Reaktion der MT450-Mammakarzinomzellen auf LiCl in Zellkultur zu testen, habe ich sie mit unterschiedlichen Konzentrationen von LiCl behandelt und nach Apoptosemerkmale untersucht: Proliferation der MT450-Zellen (Kolonie-Experiment), Aktivierung der Caspase-3 (Antikörperdetektion), PARP-Spaltung (Antikörperdetektion) und DNS-Fragmentierung.

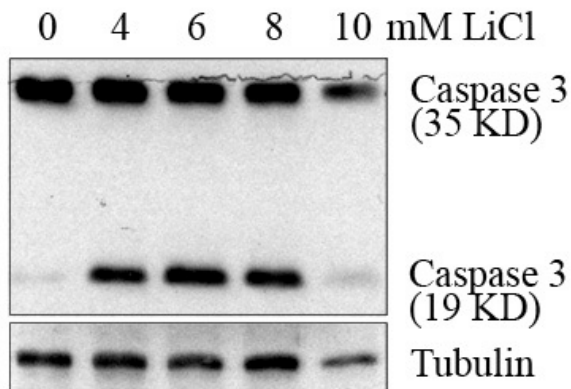
In Abbildung 15 A wurden die Zellen mit verschiedenen LiCl-Konzentrationen (5, 8 und 10 mM) behandelt und die Anzahl der Kolonien nach 2 Wochen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Kolonienzahl. Abbildung 15 B zeigt die Spaltung der Caspase-3 ab einer Konzentration von 4 mM LiCl (siehe 19 kDa-Fragment).

Das gleiche Ergebnis habe ich bei der Detektion von PARP feststellen können (siehe Abbildung 15 C). Das ungespaltene PARP-116 kDa-Fragment war bei einer Konzentration von 10 mM LiCl nicht mehr vorhanden. Im anschließenden DNS-Fragmentierungsexperiment konnte ich die Bildung der apoptotischen DNS-Leiter bereits nach 24 Stunden und ab einer Konzentration von 10 mM beobachten.

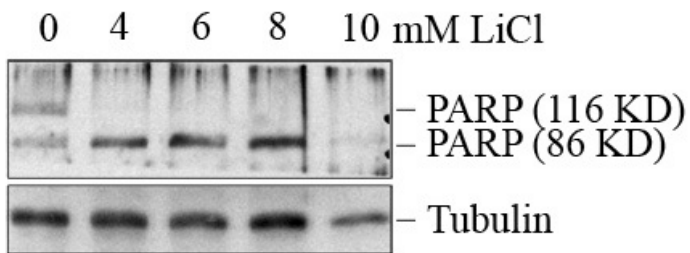
A



**B**



**C**



**D**

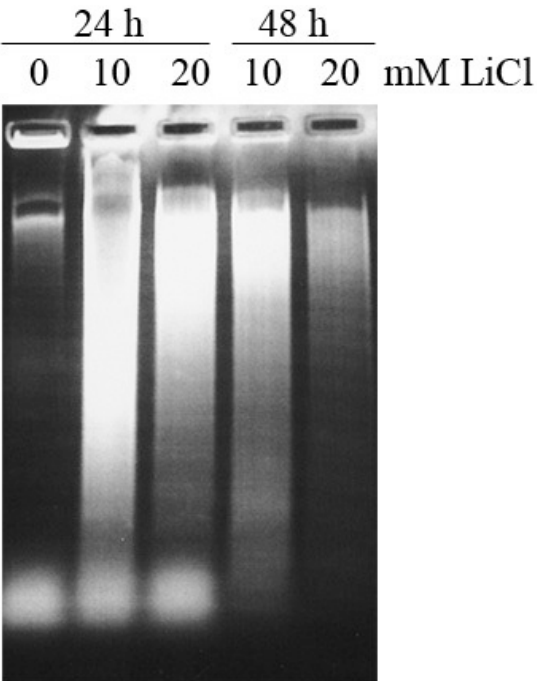


Abbildung 15: LiCl induziert Apoptose in der Mammakarzinomzelllinie MT450.

**A:**  $1 \times 10^3$  MT450-Zellen wurden in einem Gemisch aus Medium und Methylzellulose 4000 cpi, das die oben angegebene LiCl-Konzentration hatte, angesetzt. Nach 2-wöchiger Inkubationszeit wurde die Anzahl der Kolonien gezählt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl der Kolonien in der unbehandelten Probe wurde als 1 gesetzt.

**B:** MT450-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen LiCl-Konzentrationen behandelt. Zelllysate wurden mittels NP-40-Lysispuffer hergestellt und 50 µg Protein wurde in einen 10 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und mit Antikörpern gegen PARP und Tubulin als Ladekontrolle inkubiert.

**C:** Die MT450-Zelllinie wurde für 24 Stunden mit LiCl inkubiert. Zelllysate wurden mittels NP-40-Lysispuffer hergestellt und 50 µg Protein wurde in einen 15 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und mit Antikörpern gegen Caspase-3 beziehungsweise Tubulin als Ladekontrolle inkubiert.

**D:** Die MT450-Zellen wurden mit 10 oder 20 mM LiCl für 24 und 48 Stunden inkubiert oder unbehandelt gelassen. Die apoptotische DNS wurde extrahiert und in einem 1,4 %-igem Agarosegel aufgetrennt.

#### 4.8 p53-Status der MT450-Zelllinie

Das Ziel dieses nächsten Experiments war, die Reaktion des p53-Proteins der MT450-Zellen nach dem Eintreten einer DNS-Schädigung (in diesem Fall durch UV-C-Licht) zu überprüfen. UV-C ist der kurzwelligste, hochenergetischste Bereich (100-280 nm) der inoiserenden Strahlung ist und kann für den Menschen und andere Organismen gefährlich werden. Es wirkt stark zelltoxisch und mutagen. Durch weitgehende Absorption der Strahlung durch biologische Materialien, Flüssigkeiten und auch Kunststoffmaterialien hat sie nur eine geringe Eindringtiefe. Das große Zerstörungspotential der UV-C Strahlung erklärt sich durch die hohe Photonenergie der kurzen Wellenlängen, so dass durch diese Strahlung beispielweise Proteine oder Nukleinsäuren (Absorptionsmaximum bei 245 nm) zerstört werden.

Weil in den meisten Zelllinien die Menge des Tumorsuppressorproteins p53 als Folge eines DNS-Schadens über die Zeit hinweg ansteigt, habe ich MT450-Zellen 4, 8 und 24 Stunden nach UV-C-Bestrahlung geerntet. Dadurch konnte ich beobachten, dass die p53-Konzentration bereits 4 Stunden nach Exposition der Zellen mit UV-C-Strahlung erhöht war. 8 Stunden später hatte sich dieses Niveau nicht verändert, 24 Stunden später sank die Menge wieder ab (siehe Abbildung 16).

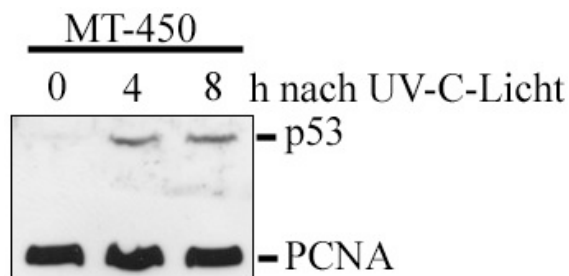


Abbildung 16: Durch UV-C-Bestrahlung steigt die Menge des p53-Tumorsuppressorproteins an. Die Proben wurden mit 50 Joule/m<sup>2</sup> behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 8 und 24 Stunden) geerntet, Zelllysate wurden mittels NP-40-Lysispuffer hergestellt und 50 µg Protein in einem 10 %-SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und mit Antikörpern gegen p53 und PCNA als Ladekontrolle inkubiert.

#### 4.9 Sequenzierung des Ratten-*p53*-Gens aus MT450-Zellen

Um Mutationen im *p53*-Gen der MT450-Zellen aus Ratten zu erkennen, habe ich seine Sequenzierung durchgeführt. Der erste Schritt hierzu war die Isolation der Gesamt-RNS-Menge. Anschließend habe ich die RNS der MT450-Zellen in cDNS umgeschrieben. Hierbei habe ich eine PCR mit den entsprechenden *p53*-Primern angesetzt, die eine EcoR1- und eine Not I- Restriktionsstelle hatten. Als Negativkontrolle diente die Reaktion ohne reverse Transkriptase. In der Abbildung 17 ist das *p53*-cDNS-PCR-Produkt bei 1200 Basenpaaren zu sehen.

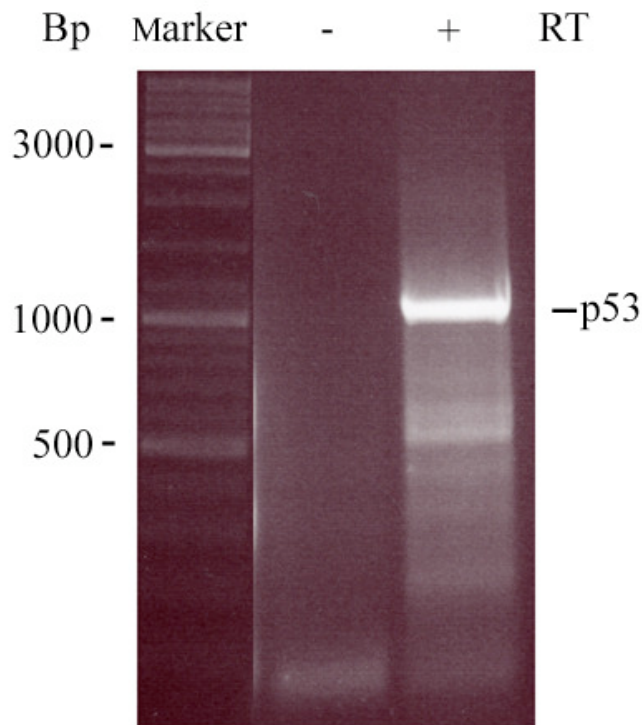


Abbildung 17: PCR-Amplifikation von *p53* aus MT450 Zellen. Die Gesamt-RNS-Menge wurde mit Hilfe des RNeasy Kits (Firma Qiagen) isoliert. Anschließend wurde *p53* durch PCR amplifiziert und auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Das gewünschte *p53*-Produkt hat eine Größe von 1200 Basenpaaren.  
RT = reverse Transkriptase

Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend aus dem Gel mit dem PeqGOLD Gel Extraktion Kit (Firma Peqlab) aufgereinigt und zum Sequenzieren zu der Firma Qiagen geschickt.

Die Sequenzierung des *p53*-Gens aus den MT450-Zellen aus Ratten enthüllte eine Mutation an der Position 174: Tryptophan (TGG) war an dieser Stelle zu Cystein (TGC) mutiert (Abbildung 18).

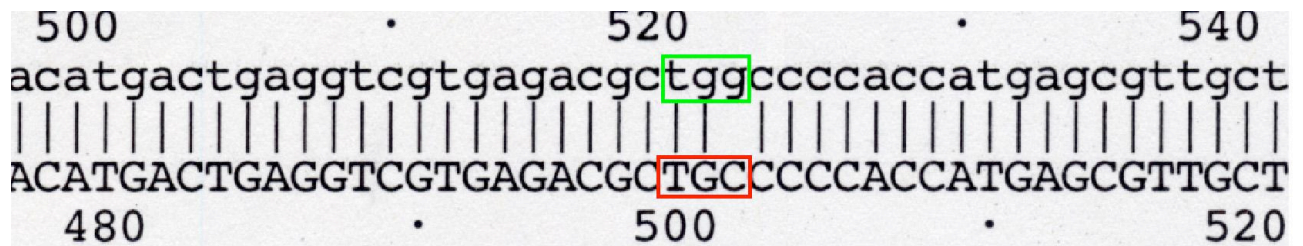
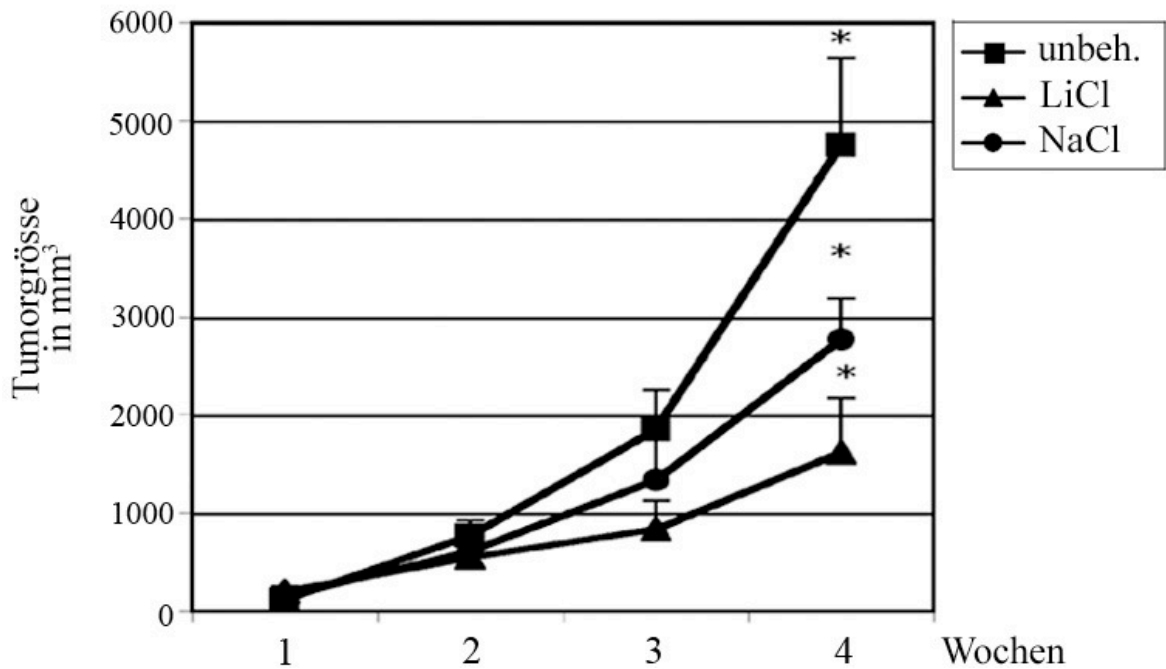


Abbildung 18: Mutation des *p53*-Gen von Ratten aus MT450-Zellen. Das aufgereinigte *p53*-PCR-Produkt (PeqGOLD Gel Extraction Kit, Firma Peqlab) wurde bei der Firma Qiagen sequenziert. Der obere Strang zeigt die Sequenz des Wildtyp-*p53*-Gens und der untere das Ratten-*p53* aus MT450-Zellen.

#### 4.10 LiCl induziert Apoptose in Tumoren von syngen Ratten

Um nachweisen zu können, dass die Inhibition der GSK-3 $\beta$  eine Auswirkung auf die Tumorgroße *in vivo* besitzt, habe ich die MT450-Zellen in syngene Ratten implantiert und die Wirkung von LiCl auf die Progression der entstandenen Tumore verfolgt. Eine Woche vor der Verpflanzung der Tumorzellen habe ich eine der drei Gruppen von Wistar-Furth Ratten ein Mal pro Tag eine LiCl-Lösung gespritzt. Als Kontrolle habe ich eine zweite Gruppe mit derselben Konzentration NaCl behandelt und die dritte Gruppe blieb unbehandelt. Regelmäßig wurde Blut von den Tieren entnommen und die Lithiumkonzentration überwacht. Als das Lithium im Blutplasma eine Konzentration von 0,4 mEq/l erreicht hat, habe ich zur Tumorentwicklung pro Ratte  $5 \times 10^6$  MT450-Zellen injiziert. Die Tiere wurden weiterhin täglich mit LiCl beziehungsweise NaCl behandelt oder blieben unbehandelt. Die tägliche Behandlung mit LiCl führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der Lithiumkonzentration im Blut auf über 0,5 mEq/l (Abbildung 19 B). Die erreichten Lithiumkonzentrationen entsprachen einer Konzentration von 8-10 mM in der Zellkultur. Diese Konzentration war in Zellkultur ausreichend um Apoptose auszulösen (siehe Abbildung 15). Das Tumorstadium wurde regelmäßig überprüft. In allen Tiergruppen haben sich die Tumore mit 100 % Penetranz entwickelt. Wie in Abbildung 19 A sichtbar haben die mit LiCl behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein signifikant niedrigeres Tumorstadium gezeigt. Die tägliche Behandlung mit Lithium zeigte keine Anzeichen von Toxizität wie zum Beispiel Gewichtsverlust oder andere Symptome, die mit erhöhten Lithiumkonzentrationen im Plasma in Verbindung gebracht werden können. Überraschend war die Feststellung, dass im Rattenmodell auch NaCl die Tumorstadium beeinflussen kann; aber mit einer niedrigeren Quote als LiCl.

A



B

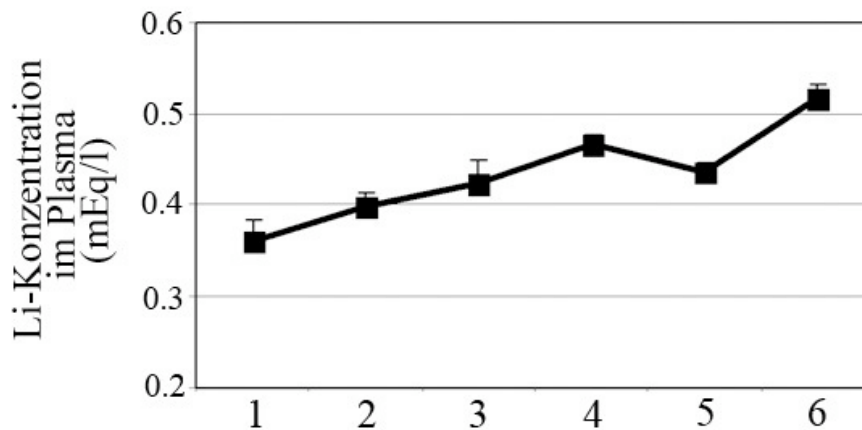


Abbildung 19: LiCl hemmt das Tumorwachstum im Rattenmodell. Wistar Ratten wurden mit 50 mg/kg LiCl oder NaCl behandelt beziehungsweise unbehandelt gelassen. Zwei Wochen nach der ersten Behandlung wurden  $5 \times 10^6$  MT450-Zellen subkutan injiziert. Die Tumorgößen (A) und die Lithiumkonzentrationen im Blut (B) wurden zwei Mal die Woche bestimmt. Der Stern weist auf eine statistische Signifikanz von  $p < 0,001$  hin. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs bis acht Tieren und die entsprechenden Lithiumkonzentrationen im Blutplasma.

Die deutlichen Unterschiede in der Tumorgöße zwischen den behandelten (LiCl/NaCl) und unbehandelten Ratten könnten folgende Gründe gehabt haben: Entweder eine niedrigere Proliferationsrate oder eine erhöhte Apoptoserate. Dies konnte durch eine histologische Untersuchung geklärt werden:

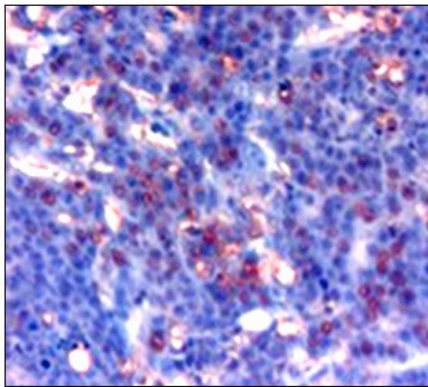


Sobald die ersten Tumore die festgesetzte Größe von 5000 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, habe ich alle Tiere getötet und die Tumorstücke histologisch analysiert. Die Paraffinschnitte habe ich mit einem Antikörper gegen PCNA inkubiert und die PCNA-positiven Zellen gezählt. Zusätzlich habe ich ein TUNEL-Experiment durchgeführt, um die Anzahl apoptotischer Zellen zu bestimmen.

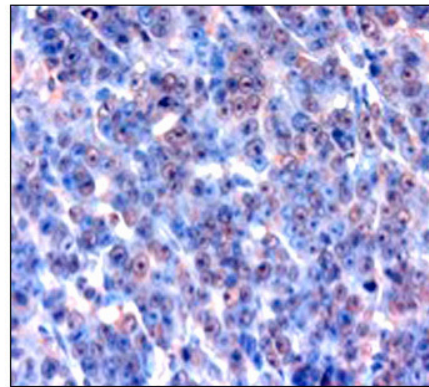
Die Tumorschnitte von Ratten, die mit LiCl oder NaCl behandelt wurden, beziehungsweise von der unbehandelten Gruppe, haben eine relativ ähnliche Anzahl an PCNA-positiven Zellen gezeigt. Die Anzahl der TUNEL-positiven und somit apoptotischen Zellen war in den Tumoren der mit LiCl-behandelten Ratten im Vergleich sowohl zur unbehandelten als auch zur NaCl-behandelten Gruppe signifikant erhöht. Die Tumorstücke von NaCl-gespritzten Tieren haben keine höhere Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt (Abbildungen 20 A und B).

### A: PCNA-Färbung

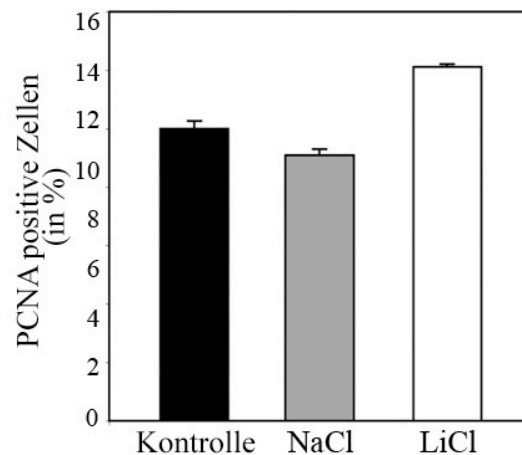
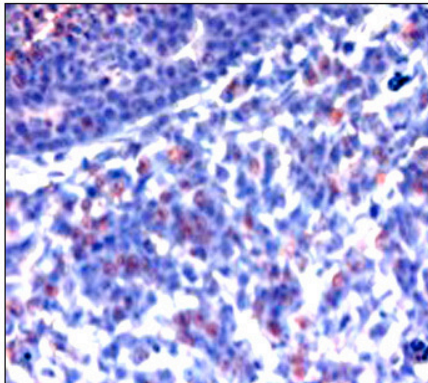
Kontrolle



NaCl

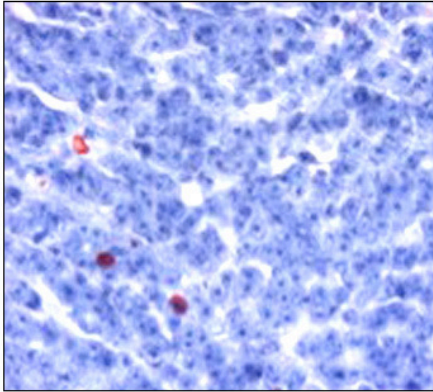


LiCl

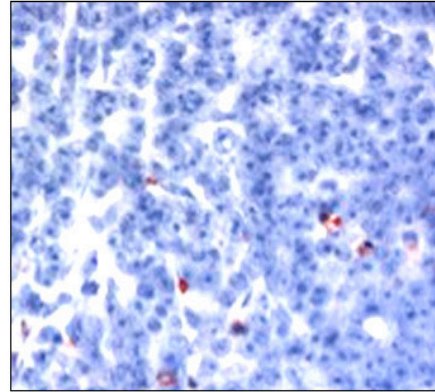


## B: TUNEL-Färbung

Kontrolle



NaCl



LiCl

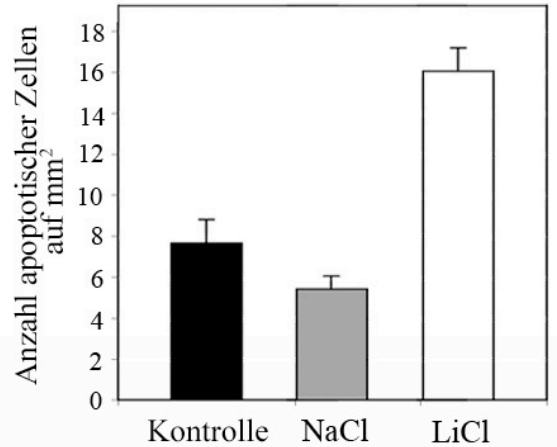
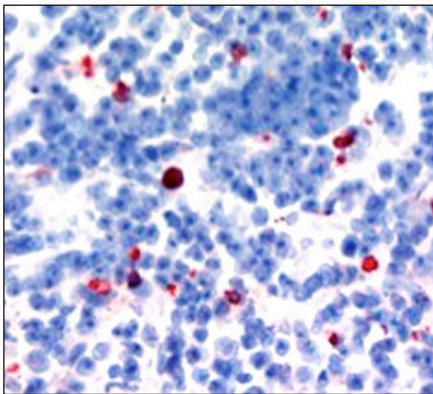


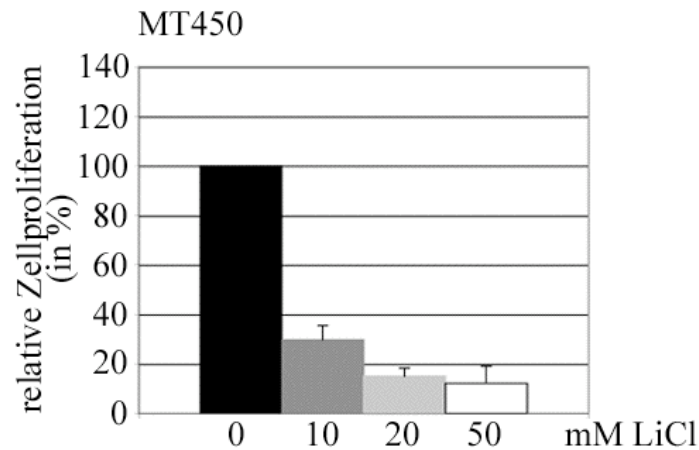
Abbildung 20: LiCl erhöht die Apoptoserate in Tumorzellen im Rattenmodell.

**A:** Die Tumore, die an der Einspritzstelle gewachsen waren, wurden präpariert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden für die Bestimmung der PCNA-Expression mit einem Antikörper gegen PCNA angefärbt. Die PCNA-positiven Zellen auf einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> wurden gezählt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der PCNA-positiven Zellen in Prozent.

**B:** Die Paraffinschnitte wurden für die Bestimmung der Anzahl der apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Experiment angefärbt. Dafür wurde das Apoptag-Kit der Firma Chemicon verwendet. Die Anzahl apoptotischer Zellen pro mm<sup>2</sup> wurde bestimmt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der apoptotischen Zellen.

Um zu überprüfen, ob die Veränderung der Tumorgöße im Rattenmodell nach NaCl-Behandlung mit einer Veränderung der Proliferationsrate in der MT450-Zellkultur nach NaCl-Zugabe einhergeht, habe ich die Zellen mit 10, 20 und 50 mM NaCl beziehungsweise LiCl zum Vergleich behandelt. Nach drei Tagen maß ich die Umsetzung von MTT zu Formazan im ELISA-Gerät. In den MT450-Zellen konnte ich jedoch bei Anwendung von NaCl keine Veränderung der Zellproliferation feststellen (siehe Abbildung 21 B im Vergleich zu 21 A).

A



B

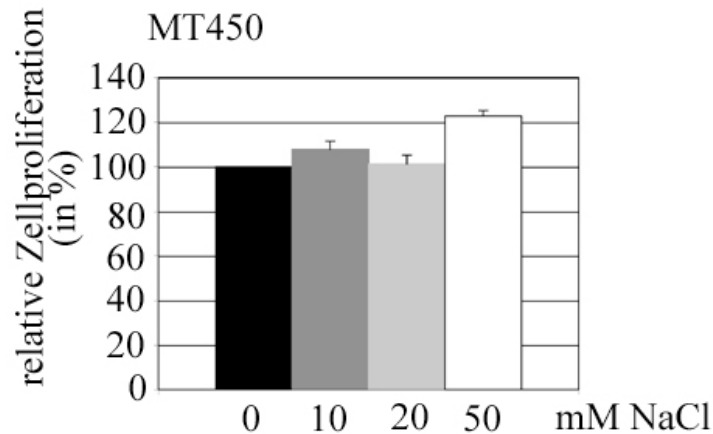


Abbildung 21: LiCl reduziert die Proliferationsrate in MT450-Rattentumorzellen.  $1 \times 10^5$  MT450-Zellen wurden angesetzt und mit den entsprechenden LiCl- und NaCl-Konzentrationen behandelt. 4 Tage nach dem Ausplattieren wurde die MTT-Lösung dazugegeben und die Umwandlung zu Formazan mittels ELISA-Messung bei 595 nm bestimmt. Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen und Standardabweichungen sind dargestellt. Die relative Zellzahl der unbehandelten Zellen wurde 100 % gesetzt (**A**: LiCl-Behandlung, **B**: NaCl-Behandlung).

#### 4.11 GM38-Fibroblasten zeigen keinen Zellzyklusarrest nach LiCl-Behandlung

In meiner Diplomarbeit habe ich die Fibroblastenzelllinie GM1604 auf ihre Reaktion auf LiCl hin untersucht. Diese Zellen sind nach dessen Gabe nicht gestorben und haben nach Entfernung von LiCl weiter proliferiert. Es wäre möglich gewesen, dass nur die spezifischen GM-Zelllinien durch das Fehlen von Merkmalen des Zelltodes nach GSK-3-Inhibition und durch fortgesetzte Proliferation nach Entfernung des Inhibitors charakterisiert sind. Deswegen war es meine Intention in meiner Doktorarbeit einen näheren Blick auf eine zweite GM-Zelllinie (GM38) bezüglich dieser Merkmale zu werfen.

Anfangen habe ich mit der lichtmikroskopischen Beobachtung der GM38-Fibroblasten nach LiCl-Gabe. Hier habe ich 48 und 72 Stunden nach Behandlung gewählt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 22 zu sehen: Weder nach 48 noch nach 72 Stunden konnte ich eine optische Abnahme in der Anzahl der vitalen Zellen feststellen.

## GM 38

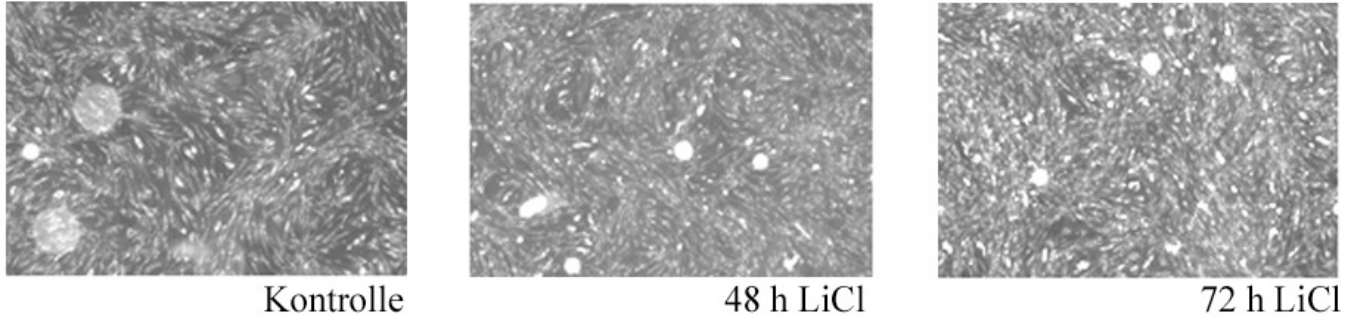


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Betrachtung der primären GM38-Zellen nach der Behandlung mit LiCl. Die Zellen wurden angesetzt, mit 50 mM LiCl behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten unterm Lichtmikroskop photographiert (72X Vergrößerung).

Weil die GM1604-Zelllinie nach dem Auswaschen des Inhibitors wieder proliferiert hatte, vermutete ich, dass die GM38-Zellen möglicherweise dasselbe Verhalten aufweisen würden. Dafür habe ich die Zellen mit LiCl für eine längere Zeit behandelt und die lebenden Zellen mittels Trypanblaufärbung gezählt. Trypanblau ist ein saurer Diazofarbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Der Farbstoff dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol ein und färbt die Zellen blau. Bei lebenden Zellen mit intakter Zellmembran dauert das Eindringen des Farbstoffs wesentlich länger. Aufgrund dieser Zeitdifferenz kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

Anschließend habe ich den Inhibitor ausgewaschen und die Zellen weiterhin gezählt. Das Ergebnis des Experiments ist in der Abbildung 22 zu sehen: Während der Zeit der LiCl-Behandlung (bis Tag 12) sieht man eine deutlich geringere Zellzahl als in der unbehandelten Kontrolle. Nach dem Entfernen von LiCl, stieg die Zellzahl wieder an.

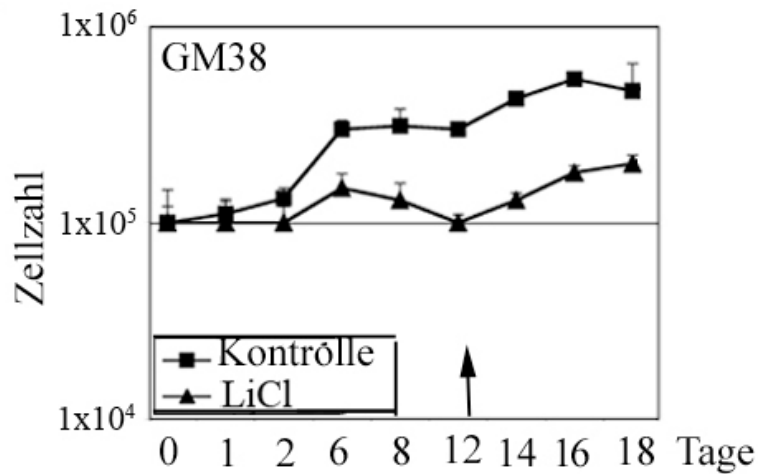
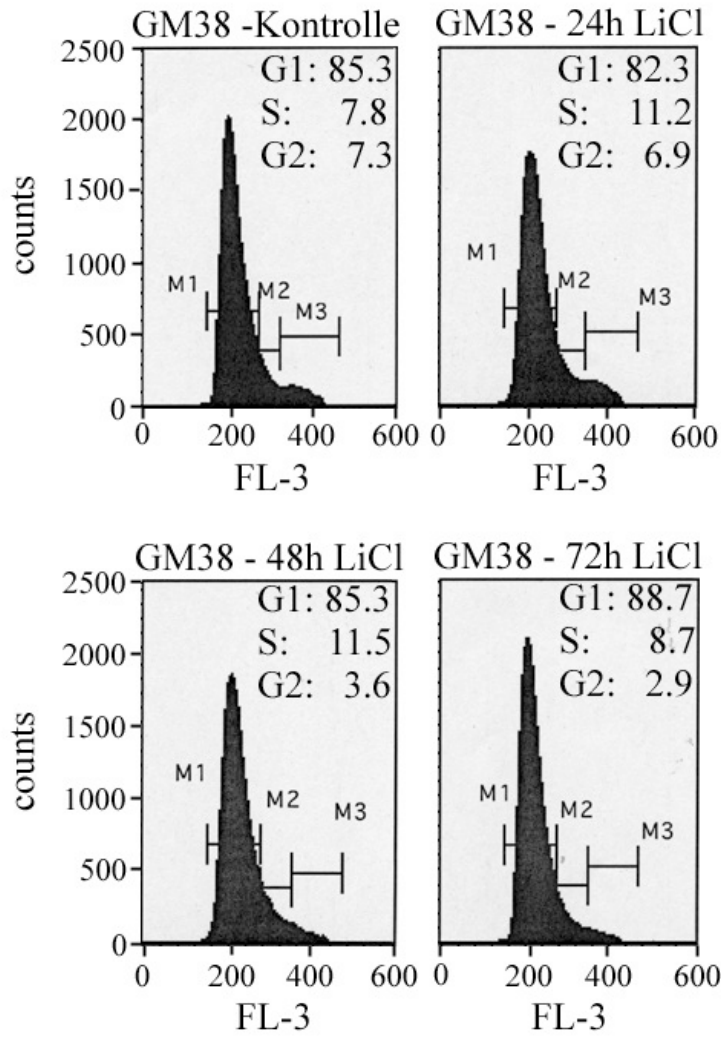


Abbildung 22: Nach Auswaschen des Inhibitors stieg die Zellzahl der GM38-Fibroblasten wieder an.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden angesetzt. Am nächsten Tag wurde den Zellen 50 mM LiCl zugesetzt und die Zählung mittels Trypanblaufärbung begonnen. Am Tag 12 nach der LiCl-Behandlung (siehe ↑) erfolgte das Auswaschen des Inhibitors und die Zellzahl wurde weiterhin bestimmt.

Um die Verteilung der GM38-Fibroblasten im Zellzyklus nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mit LiCl zu messen, habe ich die Zellen in 70%-igem Ethanol fixiert, mit Draq5<sup>TM</sup> gefärbt und am FACS-Gerät analysiert. Draq5<sup>TM</sup> ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der eine hohe DNS-Affinität hat. Das FACS-Profil dieser Zelllinie ist in der Abbildung 23 A zu sehen: Ich konnte keinen Anzeichen eines Zellzyklusarrestes oder eine andere Veränderung im Zellzyklusmuster zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen bemerken. Abbildung 23 B zeigt die statistische Auswertung. Die meisten Kontrollzellen, sowie die mit LiCl behandelten Proben befanden sich in der G1-Phase.

A



**B**

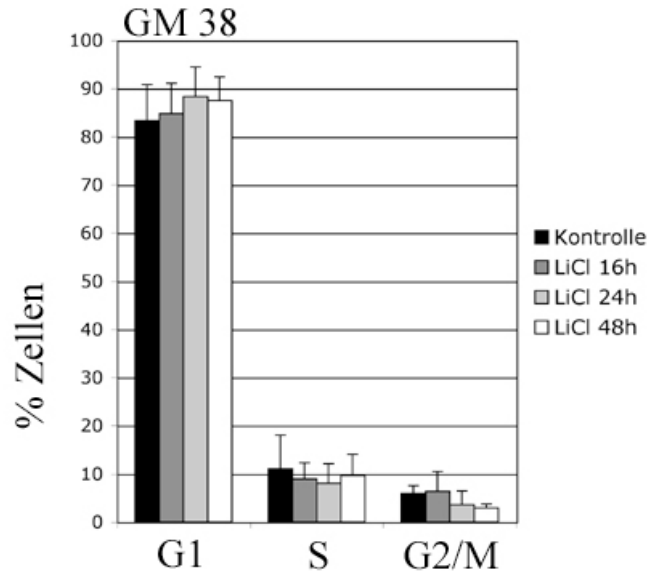


Abbildung 23: FACS-Analyse der GM38-Fibroblasten (A: FACS-Profil, B: statistische Auswertung). Fibroblasten in Passage 13 wurden angesetzt, mit 50 mM LiCl behandelt, über Nacht mit 70 %-igem Ethanol fixiert und am nächsten Tag mit Draq 5<sup>TM</sup> gefärbt.

#### 4.12 Die primären Zellen HDMEC und NHEK induzieren Apoptose nach LiCl-Behandlung

Meine Vermutung war, dass auch andere primäre Zellen nach LiCl-Behandlung keine Anzeichen eines Zelltodes zeigen. Dafür habe ich zwei weitere menschliche Zelllinien untersucht: Epidermale Endothelzellen (HDMEC) und Keratinozyten (NHEK).

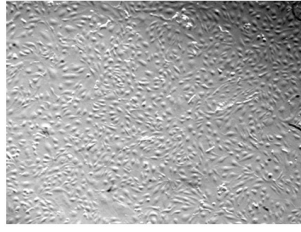
Diese primären Zellen wurden mit LiCl behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten lichtmikroskopisch analysiert. Abbildung 24 A zeigt die Ergebnisse der epidermalen Endothelzellen nach LiCl-Gabe. 8 Stunden nach Zugabe des Inhibitors war kaum ein Unterschied zu den Kontrollen zu sehen, aber 16 Stunden später beobachtete ich eine deutliche Abnahme der Zellzahl, die 48 Stunden später noch deutlicher wurde. Auch die Keratinozyten zeigten dasselbe Verhalten. In Abbildung 24 B sind die morphologischen Merkmale der Keratinozyten dargestellt. Ähnlich wie bei den Endothelzellen konnte ich nach 8-stündiger LiCl-Behandlung keine morphologische Veränderung beobachten, 16 Stunden nach Zugabe nahm aber die Anzahl an lebenden Zellen drastisch ab und 72 Stunden später waren 70 % der Zellen schon tot.

## A

HDMEC - Kontrolle



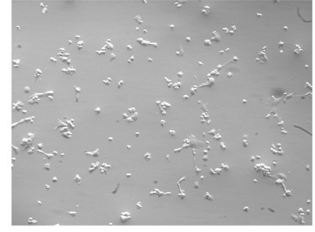
50mM LiCl - 8h



50mM LiCl - 16h

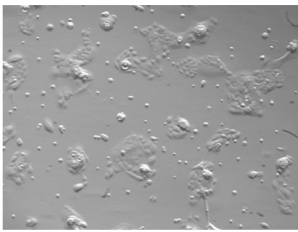


50mM LiCl - 48h

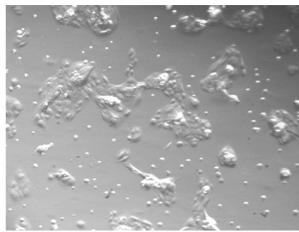


## B

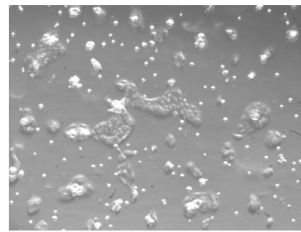
NHEK - Kontrolle



50mM LiCl - 8h



50mM LiCl - 16h



50mM LiCl - 72h

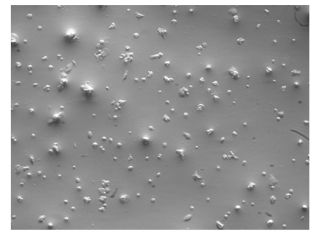


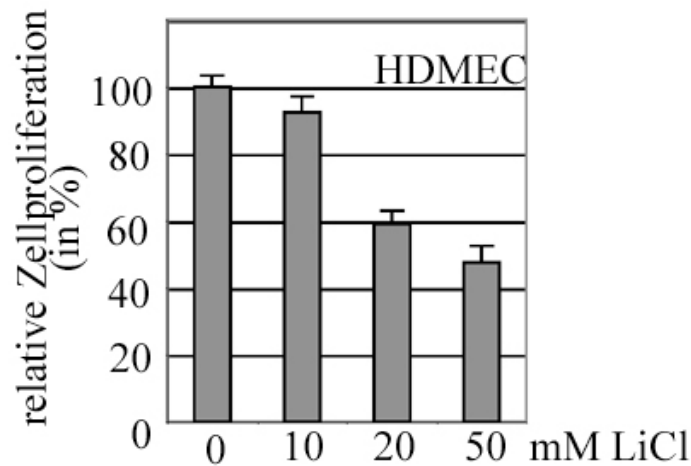
Abbildung 24: Abnahme der primären Zellen HDMEC (**A**) und NHEK (**B**) nach Behandlung mit LiCl. Diese Zellen wurden angesetzt, mit 50 mM LiCl behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten lichtmikroskop analysiert (72X Vergrößerung).

Nach der morphologischen Analyse der primären Zelllinien habe ich die Proliferationsraten untersucht. Dies wurde mittels MTT-Experiment erreicht. Die Zellen (HDMEC und NHEK) wurden dafür angesetzt, mit unterschiedlichen LiCl-Konzentrationen (10, 20 und 50 mM) für 3 Tage behandelt und die Umsetzung von MTT zu Formazan wurde am ELISA-Meßgerät (595 nm) bestimmt.

Die Ergebnisse des MTT-Experimentes sind in den Abbildungen 25 A und B dargestellt: Im Fall der HDMEC-Zellen ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellproliferation zu beobachten. Erst ab einer Gabe von 50 mM LiCl sinkt diese unter 50 %. Die NHEK-Zellen zeigen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellproliferation. Bereits ab einer Konzentration von 10 mM sinkt diese um 60 %.



A



B

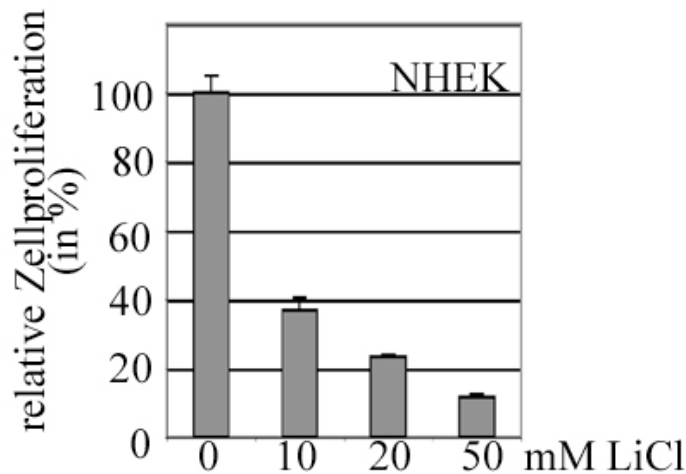


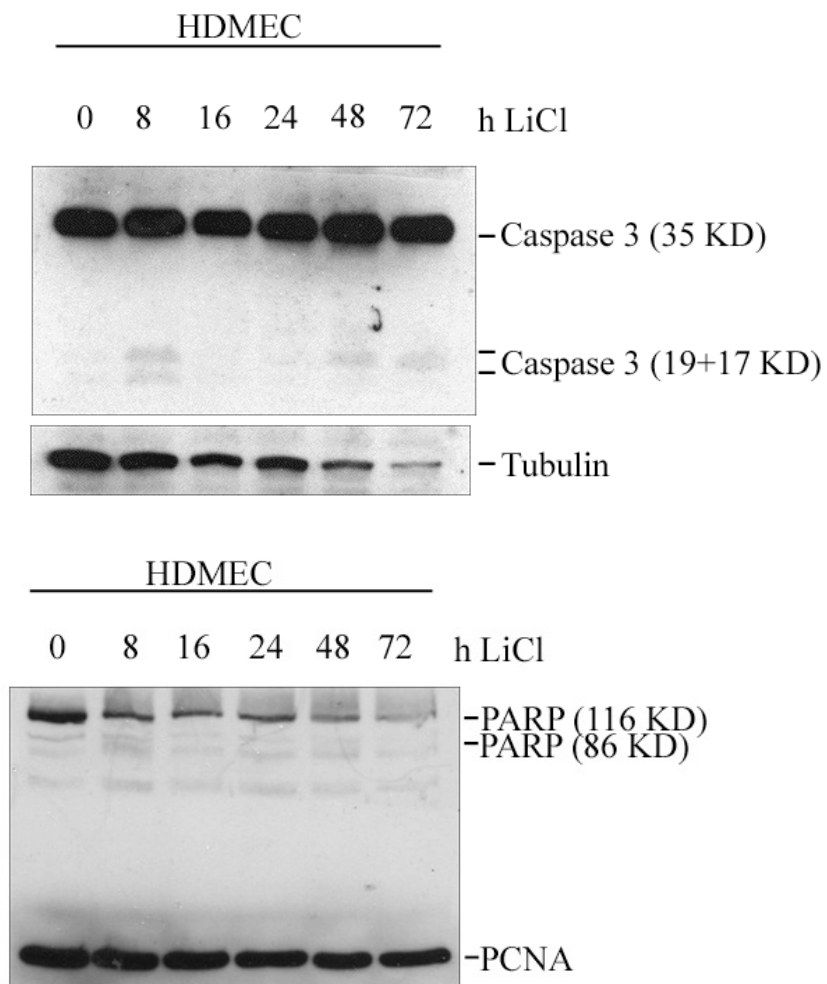
Abbildung 25: LiCl bewirkt eine Abnahme der Zellproliferation in HDMEC- und NHEK-Primärzellen.  $1 \times 10^5$  HDMEC (A)- beziehungsweise NHEK-Zellen (B) wurden ausgesät. Ein Tag später wurde LiCl in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 20 und 50 mM) dazugegeben. 4 Tage nach dem Ausplattieren wurden die Proben für 4 Stunden mit einer MTT-Lösung (1 mg/ml) inkubiert und am ELISA-Gerät bei 595 nm gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die relative Zellzahl der unbehandelten Probe wurde 100 % gesetzt.

Die ersten Anzeichen eines Zelltods waren also schon durch die oberen zwei Experimente angedeutet. Die typischen Apoptosemerkmale wie Caspase-3 Aktivierung und PARP-Spaltung würden zusätzlich Klarheit über die Art des Zelltods bringen. Dazu habe ich HDMEC- und NHEK-Zellen mit 50 mM LiCl versetzt, zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet und mittels Antikörperdetektion die Spaltung von Caspase-3 und PARP beobachtet.

Im oberen Teil der Abbildung 26 A ist zu sehen, dass die Endothelzellen sehr schnell, 8 Stunden nach LiCl-Behandlung, die Caspase-3 in die kleineren, aktiven Fragmente spaltete und bis 72 Stunden nach LiCl-Behandlung detektierbar waren. In den NHEK-Zellen fand diese Spaltung erst 48 Stunden nach GSK-3-Inhibition durch LiCl

(Abbildung 26 B) statt. Im unteren Teil der Abbildung 23 A sieht man, dass die Menge des ungespaltenen PARP (siehe 116 kDa) mit der Zeit abgenommen hatte und nach 72 Stunden sogar fast verschwunden war. Diese Tatsache ist ein Hinweis darauf, dass das große Fragment gespalten wurde, weil die PCNA-Konzentration auch nach drei Tagen noch konstant blieb. Das größere Fragment konnte detektiert werden und zeigte eine konstante Menge bis es 72 Stunden nach Behandlung abnahm. Die NHEK-Zellen zeigten erst 16 Stunden nach Zugabe von LiCl das größere der beiden Spaltprodukte (siehe unterer Teil der Abbildung 26 B). Im Vergleich zu den HDMECs war es mir bei dieser Zelllinie möglich das gespaltene PARP-Fragment zu detektieren. Nach 72 Stunden nahmen ungespaltenes Enzym und das 89 kDa-Fragment ab.

A



**B**

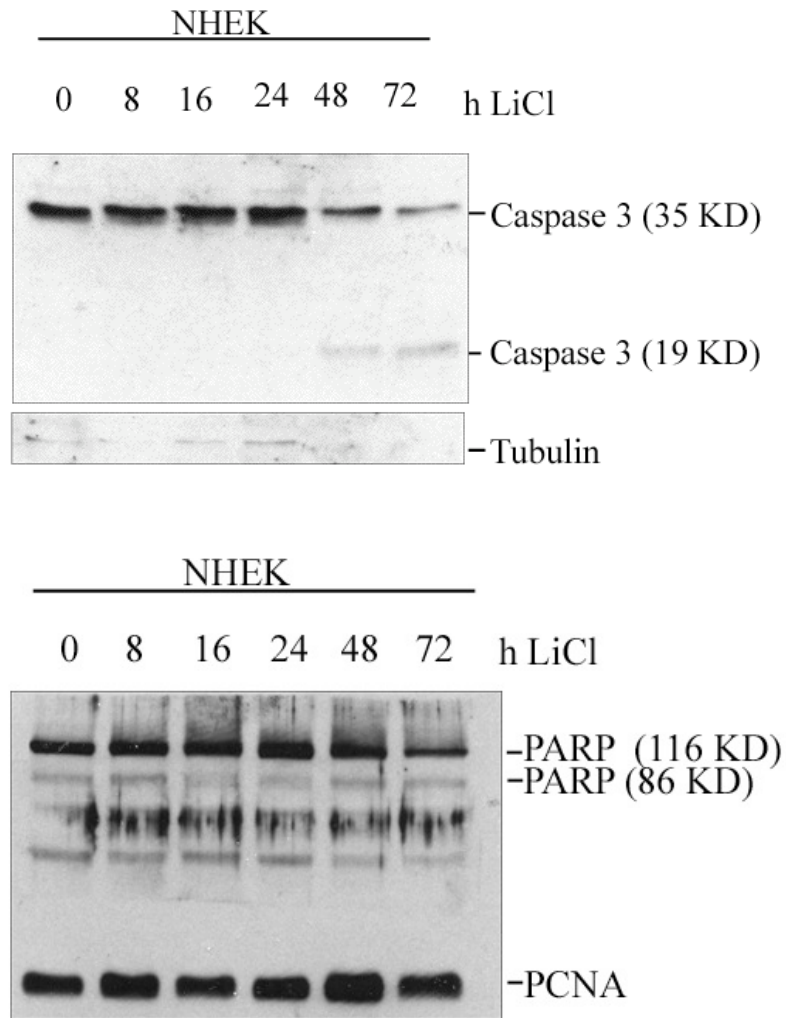


Abbildung 26: Caspase-3- und PARP-Spaltung in HDMEC- und NHEK-Zellen.

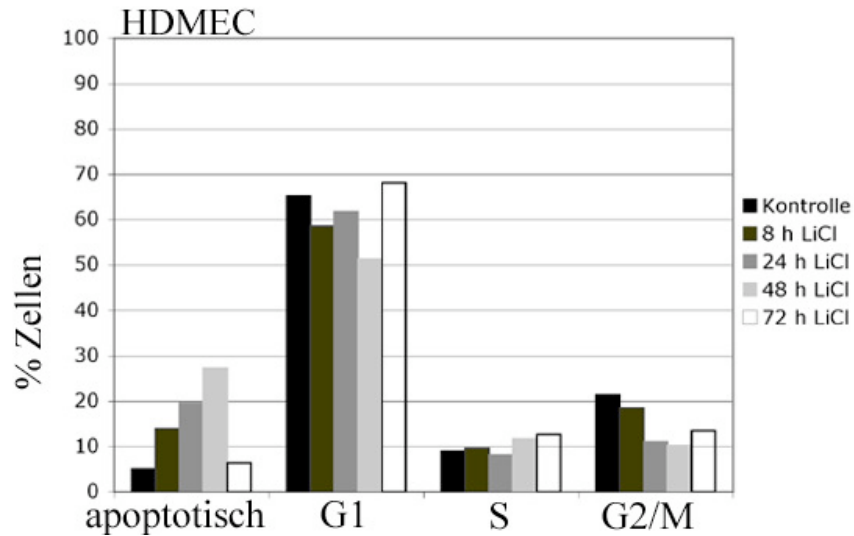
Die HDMEC (A)- beziehungsweise NHEK-Zelllinie (B) wurde mit 50 mM LiCl inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Zelllysate wurden mittels NP-40-Lysispuffer hergestellt und 50 µg Protein wurden durch ein 15 %-iges SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und mit Antikörpern gegen Caspase-3 beziehungsweise PARP und Tubulin/PCNA als Ladekontrolle inkubiert.

Durch die Zellzyklusmessung am FACS-Gerät war es möglich die Ergebnisse der obigen Experimente, also eine Induktion des apoptotischen Zelltods in HDMEC- und NHEK-Zellen, zu bestätigen: Hierzu wurden die Zellen mit 50 mM LiCl behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurden sie in 70 %-igem Ethanol fixiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Draq5<sup>TM</sup> angefärbt, der an DNS bindet.

In Abbildung 27 A und B sind die Ergebnisse der Messung graphisch dargestellt. Man sieht deutlich, dass die Anzahl der apoptotischen HDMEC-Zellen über die Behandlungszeit hinweg zunahm und einen Wert zwischen 10 und 30 % einnahm. 72 Stunden nach Behandlung sank aber die Zahl apoptotischer Zellen wieder (siehe Abbildung 27 A). Abbildung 27 B zeigt eine geringere Zunahme der apoptotischen

Zellen in einem Behandlungszeitraum von bis zu 72 Stunden als die epidermalen Endothelzellen (HDMEC).

**A**



**B**

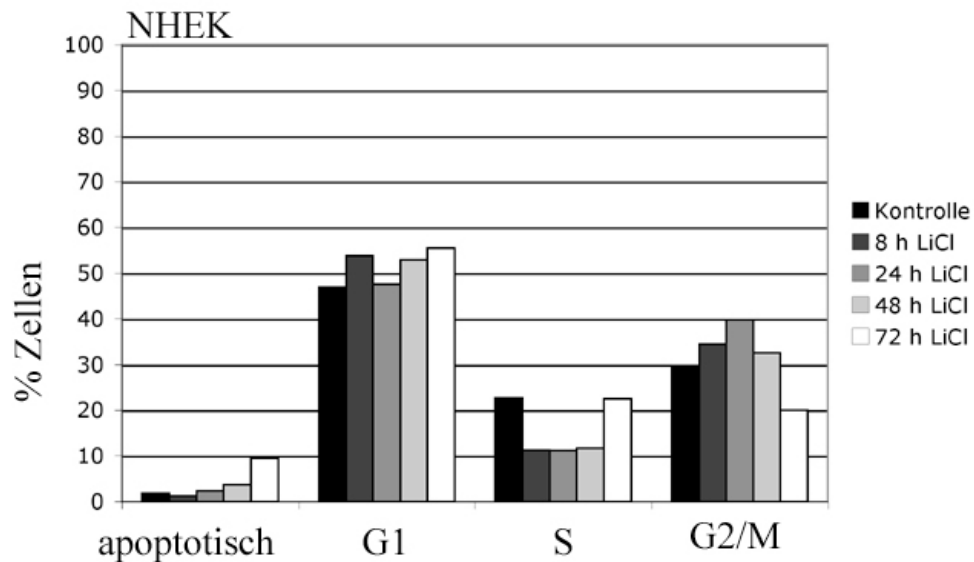


Abbildung 27: FACS-Analyse der HDMEC- beziehungsweise NHEK-Zellen. HDMEC (A)- und NHEK-Zellen (B) wurden angesetzt, mit 50 mM LiCl behandelt, über Nacht mit 70 %-igem Ethanol fixiert und am nächsten Tag mit Draq5<sup>TM</sup> gefärbt. Die Auswertung geschah am FACS-Gerät.

## 5. Diskussion

### 5.1 Inhibition von GSK-3 durch LiCl und das Auslösen der Seneszenz

Zelluläre Seneszenz ist ein genetisch festgelegtes Programm, welches in nahezu allen Körperzellen (ausgenommen Keimbahn- und Stammzellen) nach Ablauf einer begrenzten Zellteilungskapazität oder nach irreparablen Erbgutschäden aktiviert wird und weitere Zellteilungen verhindert. Seneszenz wurde erstmalig Anfang der 60er Jahre von Hayflick und Moorhead beschrieben, die mit diesem Begriff der irreversiblen "Zellalterung" die limitierte Zellteilungskapazität kultivierter humaner Fibroblasten, das so genannte "Hayflick-Limit", charakterisierten. Heute weiß man, dass Seneszenz durch irreparable DNS-Schäden induziert wird. Seneszenz wird über konservierte Signaltransduktionswege vermittelt die nach DNS-Schädigung aktiviert werden. Dementsprechend wird Seneszenz als persistierende DNS-Schadensantwort betrachtet. Alterung ist eine der Hauptursachen für den Tod eines Organismus, daneben spielen Seneszenz-Erscheinungen im normalen, katabolen Stoffwechsel (Zellabbau) eine Rolle. Diskutiert werden mehr als 300 verschiedene Ursachen des Alterns. Die betroffenen Zellen bleiben metabolisch aktiv, können über sehr lange Zeiträume weiterleben, reagieren jedoch nicht mehr auf mitogene Stimuli. Fibroblasten scheinen sich maximal nur etwa 50 Mal teilen zu können. Krebszellen setzen dieses Programm außer Kraft und erlangen so eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit. Seneszenz umfasst die im Allgemeinen nicht-reversiblen Prozesse, die zwangsläufig zum Absterben eines Organismus, seiner Organe oder einzelner Zellen führen.

Seneszenz stellt wie die Apoptose einen tumorsuppressiven Mechanismus dar. Zelluläre Alterung übt aber neben positiven auch negative Effekte auf den betroffenen Organismus aus: Seneszente Fibroblasten fördern beispielweise die Degeneration des umgebenden Bindegewebes durch eine verstärkte Sekretion verschiedener Matrix-Metalloproteinasen. Dies kann in letzter Konsequenz sogar das Wachstum und die Invasivität benachbarter Tumorzellen oder Tumorstadien fördern (Parrinello et al., 2005). Die Induktion der Seneszenz spielt auch bei der Krebstherapie eine wichtige Rolle: Chemotherapeutika greifen die DNS von Tumorzellen an und lösen so neben dem programmierten Zelltod auch Seneszenz aus. Durch die fehlende Elimination der DNS-geschädigten Zellen durch Seneszenz besteht die Möglichkeit, dass Tumorzellen später die Seneszenz überwinden. Die Ergebnisse meiner Diplomarbeit haben einen deutlichen Unterschied zwischen der Reaktion der Tumorzellen nach GSK-3-Inhibition durch LiCl beziehungsweise Alsterpaullon und dem Verhalten der primären Fibroblastenzelllinie GM1604 gezeigt. Während die untersuchten Tumorzellen Anzeichen eines Zelltods zeigten, haben die untersuchten GM1604 aufgehört zu proliferieren. Weil ein denkbarer Grund für den Wachstumsstopp die Einleitung der Zellalterung ist, habe ich die primäre Zelllinie GM38 mittels X-Gal-Färbung auf Seneszenzerscheinungen untersucht: Seneszente Zellen produzieren mehr  $\beta$ -Galaktosidase als junge Zellen oder Tumorzellen. Durch dieses Experiment konnte ich zeigen, dass LiCl keine Seneszenz in GM38 Fibroblasten, die sich in einem frühen Passagestadium (Passage 12) befanden, auslöste. Eine erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität war nur in den mit LiCl behandelten Kontrollzellen in Passage 25 zu beobachten. Die unbehandelten Zellen dieser Passage haben keine Blaufärbung

aufgewiesen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass zu wenig ausgesät wurden: Dass ich in den für 24 und 48 Stunden behandelten Zellen nur eine beziehungsweise zwei seneszente Zellen, respektive, finden konnte, unterstützt diese Erklärung.

Man kann also schlussfolgern, dass LiCl auf einer andere Art das Wachstum dieser Zelllinie hemmt. Auf den Wirkmechanismus von LiCl auf diese Zelllinie bin ich während meiner Doktorarbeit nicht näher eingegangen.

## **5.2 Inhibition der GSK-3 durch LiCl und das Einleiten des extrinsischen Apoptosesignals**

Es wurde gezeigt, dass Lithium die GSK-3 inhibieren kann und seine Wirkung *in vitro* reversibel ist (Stambolic et al., 1996). Lithium besitzt aber die Fähigkeit auch andere Kinasen zu hemmen, wie zum Beispiel Inositolmonophosphatasen, Phosphomonoesterasen und Phosphoglukomutasen (Klein und Melton, 1996, Berridge et al., 1989, York et al., 1995, Ray et al., 1978). Die Behandlung der Zellen mit Lithium inhibiert außerdem die GSK-3-abhängige Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau und induziert die Ansammlung des zyttoplasmatischen Armadillo/beta-Catenin-Proteins in PC12-Nebennierenmarkstumorzellen der Ratte und S2-Zellen von *Drosophila*, was beweist, dass Lithium das Wingless-Signal in Zellen nachahmen kann (Stambolic et al., 1996). Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Auffassung, dass der größte zelluläre Einfluss von LiCl die Inhibition der GSK-3 ist der wichtigste Beweis bleibt aber die spezifische Ausschaltung der GSK-3 durch siRNA die auch zur Caspase-3-Aktivierung geführt hatte, was zeigt, dass die Inhibition der GSK-3 für die Apoptose der auslösende Faktor ist und der Zelltod keine Nebenwirkung von LiCl oder Alsterpaullon ist.

Alsterpaullon ist ein sehr potenter Inhibitor von GSK-3, er inhibiert diese Kinase 10 Mal effektiver als die CDK1 (Knockaert et al., 2002).

Obwohl GSK-3 in vielen Signalwegen beteiligt ist, hat die Langzeitbehandlung mit LiCl, das seit vielen Jahren zur Behandlung bipolaren Störungen eingesetzt wird, zu keiner Zunahme von Krebserkrankungen oder anderen schweren Nebenwirkungen geführt (Cohen et al., 1998; Sun et al., 2007). Die bipolare affektive Störung ist eine psychische Erkrankung, die sich bei den Betroffenen durch episodische, willentlich nicht kontrollierbare und extreme Auslenkungen des Antriebs, der Aktivität und der Stimmung zeigte. Schätzungsweise 1 % der Bevölkerung ist von dieser Erkrankung betroffen.

Die Erkenntnis, dass die Krebsinzidenz dieser mit LiCl-behandelten Patienten, sich weit unter dem Wert unbehandelter Patienten befindet, lässt hoffen, dass GSK-3-Inhibitoren in der Therapie auch anderer Krankheiten Anwendung finden könnten.

In meiner Arbeit habe ich den Einfluss der GSK-3-Inhibition auf die Zellproliferation und auf das Überleben der Tumorzellen untersucht. Bereits in der Diplomarbeit konnte ich einen Einfluß von LiCl beziehungsweise Alsterpaullon auf die Überlebensrate von Tumorzellen zeigen. Die starke Abnahme an lebenden Zellen ließ mich auf die Einleitung einer Art von Zelltod hinweisen. Um zu bestimmen, ob nach Behandlung der Zellen mit LiCl oder Alsterpaullon Autophagie induziert wird, hatte ich die drei Tumorzelllinien mit MDC (Monodansylcadaverin) gefärbt (HCT116 Kolonkarzinomzellen p53-positiv und -negativ und U2Os Osteosarkomzellen). Dies läßt mich schließen, dass in diesen

Zelllinien LiCl beziehungsweise Alsterpaullon nicht zu Autophagie führt. Die genaue Art des Zelltods und den entsprechenden Signalweg konnte ich in meiner Promotionsarbeit beschreiben.

Durch meine Experimente konnte ich zeigen, dass LiCl, einer der zwei meist verwendeten Inhibitoren der GSK-3, geeignet für das Auslösen des Zelltodes in Tumorzellen ist. Während der Promotionsarbeit habe ich mich auf die Wirkung von LiCl konzentriert, weil es schon seit Jahren als therapeutischer Mittel eingesetzt wird.

Apoptose, die gängigste Art durch die eine Zelle abstirbt, war anschließend mein Fokus. In der Gegenwart der GSK-3-Inhibitoren wurde die Zellproliferation beeinträchtigt und Apoptose in allen von mir untersuchten Tumorzelllinien induziert. Obwohl in einem bestimmten Zusammenhang die GSK-3 als eine pro-apoptotische Kinase charakterisiert wurde (Frame et al., 2001) zeigten meine Ergebnisse deutlich, dass Tumorzellen die GSK-3-Aktivität zum Überleben benötigen. Nach LiCl-Behandlung haben die Zellen alle typischen Merkmale der Apoptose gezeigt: Die Caspase-3 wurde in ihre aktive Form umgewandelt, ihr Substrat, das PARP-Protein, wurde gespalten und die DNS wurde in Oligonukleosomen zerlegt.

Durch welchen molekularen Mechanismus induziert die LiCl-induzierte GSK-3-Inhibition die Apoptose? GSK-3 besitzt eine Reihe von zellulären Zielproteine, zum Beispiel ist bekannt, dass GSK-3 ein wichtiger Regulator des kanonischen Wnt-Signalweges ist (Doble und Woodgett, 2003). In unstimulierten Zellen, phosphoryliert GSK-3 die N-terminale Domäne von  $\beta$ -Catenin das anschließend ubiquitiniert und degradiert wird. Die Exposition der Zellen zum Wnt-Signal führt zur Inaktivierung und somit zur Akkumulation des  $\beta$ -Catenin-Proteins. Es ist aber eher unwahrscheinlich, dass dieser Mechanismus in der LiCl-induzierten Apoptose eine Rolle spielt, weil erhöhte Konzentrationen an  $\beta$ -Catenin ein anti-apoptotisches Effekt haben (Kim et al., 2002).

Ein weiteres sehr wichtiges Protein, dass von GSK-3 reguliert wird ist das Tumorsuppressorprotein p53. GSK-3 phosphoryliert sein Negativregulator Mdm2, an Stellen in der zentralen Domäne die für den Mdm2-abhängigen Abbau des p53-Proteins wichtig sind. Als Konsequenz, sammelt sich p53 in Abwesenheit von GSK-3 an und aktiviert die Transkription seiner Zellzyklus-arretierenden oder Apoptose-induzierenden Zielgene (Kulikov et al., 2005, Turenne und Price, 2001).

Die durch LiCl-induzierter Zelltod wird über den extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Signalweg eingeleitet, weil Caspase-8 als Folge der GSK-3-Inhibition aktiviert wurde. Die typischen Merkmale eines intrinsischen Weges waren nicht vorhanden: Eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrien ins Zytoplasma konnte ich nicht nachweisen und auch die Aktivierung der Caspase-9 hat nicht stattgefunden. Es wurde schon nachgewiesen, dass LiCl die Aktivität des Tumor-Nekrose-Faktors TNF, ein Tod-induzierendes Faktor, das Caspase-3 über den extrinsischen Weg aktiviert (Schotte et al., 2001). Außerdem wurde noch gezeigt, dass GSK-3 die Expression des Proteins Survivin, einer der anti-apoptotischen Bcl-Familie gehörenden und zugleich ein Inhibitor der Apoptose positiv beeinflusst (Panka et al., 2008).

### 5.3 p53-Unabhängigkeit der induzierten Apoptose nach GSK-3-Inhibition

Die nächste Frage war zu klären, welche molekularen Mechanismen die LiCl-abhängige Inhibition der GSK-3-Apoptose induzieren kann.

GSK-3 besitzt viele Zielproteine, zum Beispiel wurde GSK-3 seit langer Zeit mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht. In unstimulierten Zellen phosphoryliert GSK-3 die N-terminale Domäne von  $\beta$ -Catenin. Dadurch wird es ubiquitiniert, um für den Abbau durch das Proteasom markiert zu werden. Die Einwirkung von Wnt in Zellen führt zur Inaktivierung von GSK-3 und dementsprechend zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. Hingegen ist es eher unwahrscheinlich, dass  $\beta$ -Catenin eine Rolle in der LiCl-induzierten Apoptose nach GSK-3-Inhibition spielt, weil eine erhöhte  $\beta$ -Catenin-Konzentration einen anti-apoptotischen Effekt ausüben kann.

Ein weiteres sehr wichtiges Protein, das unter der Kontrolle der GSK-3 steht, ist das Tumorsuppressorprotein p53: GSK-3 kann das Onkoprotein Mdm2 in seiner zentralen Domäne an Stellen phosphorylieren, die im Mdm2-abhängigen Abbau von p53 eine primäre Rolle spielen (Kulikov et al., 2005). Die Wirkung ist, dass sich die Menge an p53-Protein in der Abwesenheit der GSK-3 erhöht und seine Zielgene aktiviert. Unter anderem sind dies, Gene die Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren können. Ghosh und Altieri konnten außerdem 2005 einen Zusammenhang zwischen p53 und dem Auslösen der Apoptose in Kolonkarzinomzellen zeigen.

Trotz des oben gezeigten Zusammenhangs zwischen GSK-3-Inhibition und p53-Aktivierung, hat p53 in meinen Experimenten nur eine geringfügige Rolle beim Auslösen des Zelltods als Folge der GSK-3-Inhibition gehabt: In beiden p53-positiven und p53-negativen Zelllinien wurde die Apoptose nach der LiCl-Behandlung eingeleitet. Der einzige Unterschied zwischen den Zellen war, dass sowohl die PARP-, als auch die Caspase 3-Spaltung und die DNS-Fragmentierung in den p53-defizienten Zellen verringert oder später aufgetreten war. Im Einklang mit diesen Ergebnissen ist der programmierte Zelltod in den Zellen, wo p53 aktiv war, früher ausgelöst worden. Aus diesen Befunden folgte ich, dass Zelltod durch mindestens zwei Signalwege eingeleitet werden kann: p53-abhängig und -unabhängig. Durch meine Daten war es möglich zu zeigen, dass in dem Fall, wo p53 abwesend war, in Tumorzellen ein alternativer Zelltod-induzierender Weg eingeleitet wurde. Der genaue Mechanismus dieses alternativen Signalweges ist bis jetzt noch nicht geklärt. Es ist aber schon bekannt, dass LiCl die Aktivität des Tumornekrosefaktors (TNF) erhöht. TNF ist ein Zytokin, das an der Vermittlung einer Vielzahl verschiedener zellulärer Antworten beteiligt ist. Eine davon ist, dass TNF die Caspase-3 über den extrinsischen Apoptoseweg induzieren kann (Schotte et al., 2001). Es wurde berichtet, dass GSK-3 die Expression anti-apoptotischer Mitglieder der Bcl-Familie positiv beeinflusst, aber auch einen Einfluss auf den Apoptoseinhibitor Survivin hat (Panka et al., 2008).

Eine weitere Möglichkeit einer p53-unabhängigen Apoptose wäre, dass LiCl oxidativen Streß auslöst: Oxidativer Streß kann die Fähigkeit von p53 reduzieren an seiner Konsensuserkennungsstelle der DNS zu binden und somit die Transkription p53-spezifischer Reportergene zu aktivieren. p21<sup>CIP1</sup> kann durch oxidativen Streß aktiviert werden und dadurch Zelltod induzieren (Russo et al., 1995). WAF1/CIP1 kodiert für einen 21-kDa-(p21)-Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinaseaktivitäten, die für das Fortschreiten von G1- zu S-Phase des Zellzyklus notwendig sind.



Meine Daten haben eine wichtige Auswirkung hinsichtlich der Krebstherapie: Die Induktion des Zelltodes durch GSK-3-Inhibition ist p53-unabhängig. In Anbetracht der Tatsache, dass ungefähr 50 % der Tumore eine Mutation im *p53*-Gen tragen, könnte die Inhibition der GSK-3 auch für die Behandlung der p53-negativen Tumore, die zu anderen Behandlungsmethoden refraktär sind, hilfreich sein.

#### 5.4 LiCl und seine Wirkung im Rattenmodell

Durch mein Rattenexperiment war es mir möglich zu zeigen, dass die Inhibition der GSK-3 durch LiCl nicht nur in Zellkulturexperimenten Apoptose induzieren kann, sondern auch *in vivo*, wie ich bei den mit nicht-toxischen-LiCl-Konzentrationen behandelten Ratten zeigen konnte: Die Tumorgrößen in den mit LiCl-behandelten Tieren waren signifikant niedriger als diejenigen der unbehandelten und der mit NaCl behandelten Gruppe. Ein überraschender Befund war, dass die Behandlung von Ratten mit NaCl auch eine Abnahme in der Tumorgröße gezeigt hatte. Aber in den durchgeführten Zellkulturexperimenten konnte ich keine Beeinträchtigung der Zellproliferation oder eine Zunahme der Apoptoserate nach der Behandlung der Zellen mit der gleichen NaCl-Konzentration nachweisen. Eine denkbare Erklärung dafür könnte sein, dass die Tumor-hemmende Aktivität von NaCl möglicherweise einen intakten Organismus benötigt mit den Funktionen jedes Gewebes und jedes Organs im Einzelnen. Es ist aber auch wichtig festzuhalten, dass ich keine Symptome von Hypernatremia (erhöhte Natriumkonzentration im Blutplasma) in den zu untersuchenden Tieren feststellen konnte. Die typischen Anzeichen der Hypernatremia sind Verwirrung, Lähmung der Lungenmuskulatur und sogar Koma. Mögliche molekulare Mechanismen können dabei die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, pro-inflammatorischen Faktoren und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sein (Gu et al., 2006, Quiroz et al., 2003, Trolliet et al., 2001).

Die Injektion der Ratten erfolgte intraperitoneal, direkt in der Nähe des Tumors. Es wäre also auch möglich, dass die Tumorzellen an dieser Stelle aufgrund der hohen Konzentration der Lösung in Apoptose/Nekrose gegangen sind. Weder eine Wirkung von NaCl auf die MT450-Zellen in der Zellkultur (MTT-Experiment) noch eine erhöhte Proliferationsrate war in den histologischen PCNA-Färbungen festzustellen.

Durch diese Ergebnisse schlussfolgerte ich, dass die Minderung der Tumorgröße in den LiCl-behandelten Tieren durch Induktion der Apoptose kommt. Die konstante Lithiumkonzentration, die ich in allen Tieren erreichen konnte, befindet sich in dem Bereich der Werte, die von Menschen tolerierbar sind (Chiu et al., 2007). Ein sehr wichtiger Punkt ist auch, dass ich während des ganzen Versuchs keine toxischen Nebenwirkungen beobachten konnte, wie zum Beispiel Gewichtsverlust oder Apathie der Tiere. Darüber hinaus habe ich eine sehr starke Beeinträchtigung der Zellproliferation und Induktion der Apoptose in Zellkulturexperimenten mit den MT450-Zellen nachweisen können, wobei ich niedrigere LiCl-Konzentrationen benutzt habe als im Tierexperiment.

Durch die Sequenzierung des *p53*-Gens aus den MT450-Rattenzellen, konnte ich eine Mutation am Tryptophan 174 zeigen. Diese Mutation liegt in der direkten Nachbarschaft

von Arginin 173, das in vielen Krebsarten zu Histidin mutiert ist, und somit auch in der DNS-Bindedomäne von p53. Die Zellkulturexperimente haben zwar eine erhöhte p53-Expression in dieser Zelllinie nach UV-C-Strahlung gezeigt, aber durch diese Mutation ist es möglich, dass p53 als Transkriptionsfaktor für proapoptotische Zielgene inaktiv bleibt. Die MT450-Zellen haben aber trotzdem die typischen Apoptosemerkmale (Caspase-3-Aktivierung, PARP-Spaltung, DNS-Fragmentierung) nach LiCl-Behandlung gezeigt, woraus ich schließe, dass diese Art von Apoptose p53-unabhängig ist.

## **5.5 Einfluß von LiCl auf primäre Zellen**

Für meine Arbeit war es wichtig zu untersuchen, ob primäre Fibroblasten dieselbe Reaktion auf GSK-3-Inhibition zeigen (Auslösen der Apoptose), oder ob sie vielleicht mit Zellzyklusarrest reagieren. Die heute in der Tumorthherapie angewandten Substanzen können nicht nur die Krebszellen töten sondern auch gesunde Zellen im Körper.

Während meiner Diplomarbeit habe ich gezeigt, dass die GM1604-Fibroblastenzelllinie nach GSK-3-Inhibition durch LiCl-Zugabe keine Apoptose induzierte, sondern sie nicht weiter proliferiert hatte. In meiner Promotionsarbeit habe ich nun auch andere primäre Zellen untersucht: HDMEC, Endothelzellen und NHEK, Keratinozyten. Ich erhielt aber nicht die zu erwartenden Ergebnisse, denn auch diese Zellen haben nach LiCl-Behandlung Apoptose eingeleitet. Die FACS-Analyse zeigte bei den HDMEC-Zellen, dass 72 Stunden nach GSK-3-Inhibition weniger Zellen als vorher apoptotisch waren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass nach drei Tagen nur noch Zelltrümmer vorliegen, aber das Gerät nur intakte Zellen ausmessen kann.

Bei der FACS-Analyse der NHEK-Zellen waren die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus schwer zu unterscheiden; sie zeigten aber auch eindeutig Apoptosemerkmale. Die zweite GM-Fibroblastenzelllinie, GM38, hatte in der FACS-Analyse keinen Zellzyklusarrest gezeigt. Nach dem Entfernen des LiCl-Inhibitors waren sie aber in die Wachstumsphase zurück gekehrt und haben erneut proliferiert. Diese Tatsache lässt mich schlußfolgern, dass primäre Zellen, wie die GM-Fibroblasten, die HDMEC- und die NHEK-Zellen, eine unterschiedliche Antwort auf Inhibition der GSK-3 zeigen.

Meine Promotionsarbeit kann ich also wie folgt Zusammenfassen: LiCl, das gängige Mittel gegen mentale Störungen, hemmt die GSK-3 und induziert Apoptose in den p53-positiven und -negativen Tumorzelllinien (HCT116, U2Os, MT450). Eine p53-Abhängigkeit konnte ich nicht nachweisen. In den p53-defizienten Zellen tritt Apoptose mit Verzögerungen ein. Die Apoptose der Tumorzellen wird über den extrinsischen, Rezeptorvermittelten Weg eingeleitet.

Die Behandlung der primären Zellen HDMEC (Endothelzellen) und NHEK (Keratinozyten) hatte dieselben Apoptosemerkmale gezeigt, wie die von mir benutzten Tumorzellen. LiCl hatte aber einen unterschiedlichen Effekt auf die Fibroblasten (GM1604 und GM38) gehabt: Die Proliferation wurde dabei unterdrückt und nach dem Auswaschen des Inhibitors fingen die Zellen wieder an zu proliferieren.

Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass LiCl als Mittel in der Tumorthherapie eingesetzt werden kann und dass dabei möglicherweise nur die betroffenen Krebszellen in Apoptose

gehen. Weil in ungefähr 50 % der Fälle p53 abwesend oder mutiert ist, würde die Anwendung von LiCl der Vorteil haben, dass auch p53-negative Tumorzellen in gleicher Maßen wie die p53-positiven Zellen dabei sterben würden.

## 6. Ausblick

### 6.1 Isolierung des DISC-Komplexes

Eine Identifizierung des Todesrezeptors (Rezeptor für den Tumor-Nekrose-Faktor TNF-R1, Fas (CD95), DR3, DR5 und DR6), der für die Einleitung des extrinsischen Apoptoseweges verantwortlich ist, würde der letzte Schritt in der Aufklärung des LiCl-induzierten Apoptoseweges sein.

Die Inhibition der GSK-3 durch LiCl wurde mit der Aktivierung des TNF-Rezeptors in Verbindung gebracht (Schotte et al., 2001, Schwabe und Brenner, 2002). Der lethale Phänotyp der GSK-3 $\beta$ -defizienten Mäuse kann durch TNF gerettet werden, und das weist auf die Beteiligung des TNF-Rezeptors im Zelltod hin. Um diese Tatsache auch für den Fall von LiCl nachweisen zu können, habe ich mit Co-Immunpräzipitationsexperimenten angefangen: Hier versuche ich im Falle einer Aktivierung des TNF-Rezeptors den DISC-Komplex ("death inducing signaling complex") zu isolieren. Die ersten vorläufigen Ergebnisse waren noch nicht eindeutig und ich versuche die Bedingungen der Reaktion zu verbessern. Die Immunpräzipitation habe ich mit einem Antikörper gegen Caspase-8 durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einem Antikörper gegen das RIP-Protein, eine weitere Komponente des DISC-Komplexes.

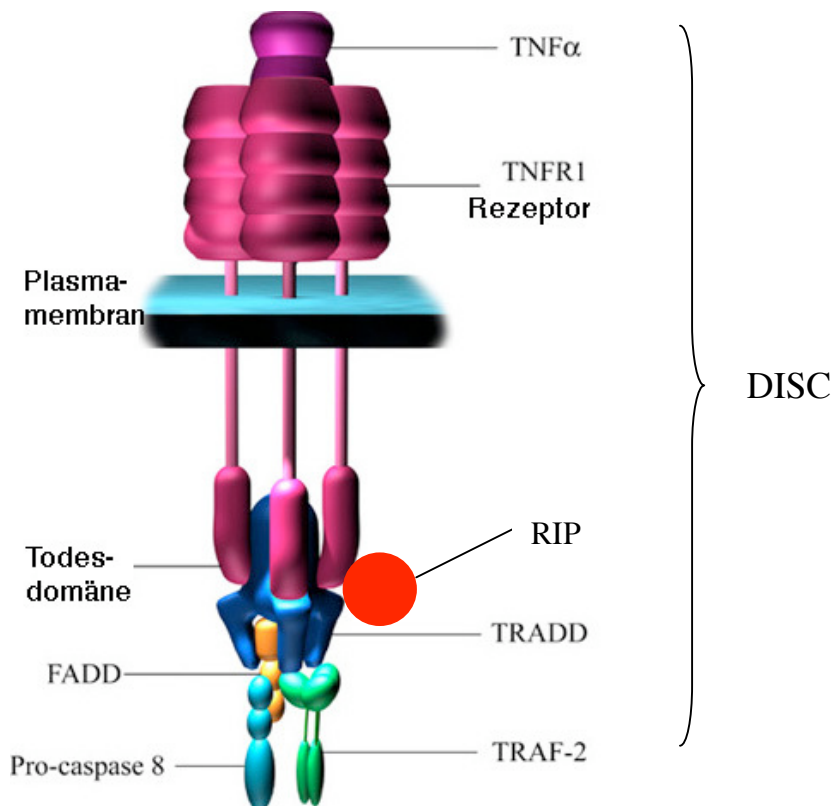


Abbildung S1: Bildung des DISC-Komplexes durch die Aktivierung des TNF-Rezeptors. Sein Ligand zusammen mit dem trimerisierten Rezeptor und den Adapterproteinen FADD, TRADD, RIP, TRAF-2 und die Procaspase -8 bilden das Multiproteinkomplex DISC (Abbildung aus [www.sgul.ac.uk](http://www.sgul.ac.uk)).

Nach dem Nachweis der Aktivierung eines der Todesrezeptoren bleibt noch zu klären, wie genau LiCl den Rezeptor aktiviert. Dafür gibt es drei Hypothesen: 1) LiCl hat einen Einfluß auf einem Liganden, infolgedessen er am Rezeptor bindet, 2) LiCl wirkt direkt auf der Rezeptorebene und führt zu seiner Trimerisierung und zur Bildung des DISC-Komplexes oder 3) er bindet selbst an dem Rezeptor und ruft die Aktivierung der Caspasekaskade hervor.

### **6.2 p53-unabhängige Apoptose und Apoptoseinduktion des mutierten *p53*-Gens von Ratten MT450-Zellen**

Eine p53-Abhängigkeit der Kolonkarzinomzellen nach GSK-3-Inhibition konnte ich nicht zeigen. Ob diese Art des programmierten Zelltods auch für andere p53-negativen Tumorzellen gilt, wäre ein weiterer interessanter Punkt. In derselben Hinsicht sind auch weitere Experimente mit den MT450-Zellen durchzuführen, um zu untersuchen ob die Mutation am Tryptophan 147 wichtig für die p53-Aktivierung ist oder nicht.

### **6.3 Einfluß von LiCl auf andere primäre Zellen**

Meine Ergebnisse konnten keine Klarheit darüber bringen wie LiCl auf primäre Zellen wirkt. Hierfür ist eine genauere Untersuchung weiterer primären Zellen notwendig. Die GM-Fibroblasten haben keine Apoptosemerkmale gezeigt, aber die Induktion von Zellzyklusarrest war auch nicht eindeutig. Weitere Experimente in dieser Richtung würden also in der Weiterentwicklung von LiCl als Antitumormittel sehr hilfreich sein.

## 7. Referenzen

Die folgenden Quellen wurden zur Erstellung dieser Arbeit verwendet:

Aggarwal BB. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745-56.

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10114-18.

Ankarcrona, M, Dypbukt, J. M, Bonfoco, E, Zhivotovsky, B, Orrenius, S, Lipton, S. A, and Nicotera, P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15 (4), 961-73.

Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with  $\beta$ -catenin, APC, and GSK-3 $\beta$ . *Science* 280, 596-99.

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. 1996. Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-42.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. 1989. Neuronal and developmental actions of lithium : a unifying hypothesis. *Cell* 59, 411-19.

Beurel E, Jope RS. 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol*, 79(4), 173-89.

Bijur GN, De Sarno P, Jope RS. 2000. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J. Biol. Chem.* 275, 7583-90.

Blattner C, Hay T, Meek D, Lane DP. 2002. Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6170-82.

Burns TF, El\_deiry WS. 1999. The p53 pathway and apoptosis. *J. Cell, Physiol.* 181, 231-39.

Campisi J. 2001. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp. Gerontol.* 36, 607-18.

Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, Roninson IB. 1999. Role of p53 and p21<sup>waf1/cip1</sup> in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 18, 4808-18.

Chiu C-C, Shen WW, Chen K-P, Lu M-L. 2007. Application of the Cockcroft-gault method to estimate lithium dosage requirement. *Psychiatry and Clin. Neurosci.* 61, 269-74.

Cohen P, Alessi DR, Cross DA. 1997. PDK1, one of the missing links in insulin signaling transduction? *FEBS Lett.* 410, 3-10.

Cohen Y, Chetrit A, Sirota P, Modan B. 1998. Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med. Oncol.* 15, 32-6.

Dale TC. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* 329, 209-23.

DePaoli-Rouch AA. 1984. Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by FA/GSK-3 and casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 259, 12144-52.

Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ. 1993. Gain of function mutations in p53. *Nat. Genet.* 4(1), 42-6.

Doble BW und Woodgett JR. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell. Sci.* 116(Pt7), 1175-86.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* 107, 519-27.

Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. 1996. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7464-9.

Fiol CJ, Haseman JH, Wang YH, Roach PJ, Roeske RW, Kowalczyk M, DePaoli-Rouch AA. 1988. Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase-3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 797-802.

Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death&Differentiation* 10, 76-100.

Forde EJ, Dale CT. 2007. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1930-44.

Frame S, Cohen P. 2001. GSK-3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359(Pt1), 1-16.

Gosh JC, Altieri DC. 2005. Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in colorectal cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 11(12), 4580-88.

Gottlieb TM und Oren M. 1998. p53 and apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 8, 359-68.

Green DR und Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.

Grimes CA und Richard SJ. 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Progress in Neurobiology* 65(2001), 391-426.

Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. 1998. Downregulation of  $\beta$ -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor,  $\beta$ -catenin and GSK-3 $\beta$ . *Curr. Biol.* 8, 573-81.

Hayflick L und Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* 25, 585-621.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53 and p21 (CIP1), but not p16 (INK4a). *Mol. Cell* 14, 501-13.

Hoeflich KP, Luo J, Rubie E, Tso MS, Jin O, Woodgett JR. 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation. *Nature* 406, 86-90.

Huang DC und Strasser A. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-42.

Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR, 1993. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 12, 803-808.

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. 1998. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* 17, 1371-84.

Itahana K, Campisi J, Dimiri GP, 2004. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5, 1-10.

Itoh K, Krupnik V,E, Aokol SY. 1998. Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and  $\beta$ -catenin. *Curr. Biol.* 8, 591-94.

Johnson-Farley NN, Travkina T, Cowen DS. 2006. Cumulative activation of akt and consequent inhibition of glycogen synthase kinase-3 by brain derived neurotrophic factor



and insulin-like growth factor-1 in cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1062-69.

Jope RS. 1999. A bimodal model of the mechanism of action of lithium. *Mol. Psychiatr.* 4, 21-25.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-57.

Kim K, Pang KM, Evans M, Hay ED. 2002. Overexpression of  $\beta$ -Catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol. Biol. Cell* 11, 3509-23.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-88.

Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, Kikuchi A. 1998. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of  $\beta$ -catenin. *J. Biol. Chem.* 273, 10823-26.

Klein PS und Melton DA. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8455-59.

Knockaert M, Wieking K, Schmitt S, Leost M, Grant KM, Mottram JC, Kunick C, Meijer L. 2002. Intracellular targets of paullones. *J. Biol. Chem.* 277, 25493-501.

Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95.

Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, Wilting J, Sleeman JP. 2003. Differential *in vivo* and *in vitro* expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res.* 63(3), 713-22.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 619-42.

Kulikov R, Boehme KA, Blattner C. 2005. Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol. Cell. Biol.* 25(16), 7170-80.

Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* 9(4), 358-61.

- Leist, M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. 1995. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am.J.Pathol.* 146 (5), 1220-34.
- Leist M und Jaatela M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 589-98.
- Leist, M und Nicotera, P. 1997. The shape of cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 236 (1), 1-9.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, Zhangg Z, Lin X, He X. 2002. Control of  $\beta$ -Catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-42.
- Loberg RD, Veselya E, Brosius FC 3<sup>rd</sup>. 2002. Enhanced glycogen synthase kinase-3beta activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J. Biol. Chem.* 277, 41667-73.
- Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. 2000. Genes involved in senescence and immortalization- *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 705-9.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. 1993. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1-beta converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 72, 653-60.
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC. 2002. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J. Neurochem.* 81, 1073-83.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Nicholson DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1028-42.
- O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. 1999. Fas counter-attack--the best form of tumor defense? *Nat Med.* 5, 267-68.
- Panka DJ, Cho DC, Atkins MB, Mier JW. 2008. GSK-3b inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines. *J. Biol. Chem.* 283, 726-32.

Parker PJ, Caudwell FB, Cohen P. 1983. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues *in vivo*. Eur. J. Biochem. 130, 227-34.

Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation.

Peifer M, und Polakis P. 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis: a look outside the nucleus. Science 287, 1606-09.

Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR. 1992. Glycogen synthase kinase-3: functions in pncogenesis and development. Biochim. Biophys. Acta. 1114, 147-62.

Ray WJ Jr, Szymanki ES, Ng L. 1978. The binding of lithium and of anionic metabolites to phosphoglucomutase. Biochim. Biophys. Acta 522, 434-42.

Rouch PJ. 1990. Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. FASEB J. 4, 2961-68.

Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, jackman J, O'Connor PM, Anderson CW, Appella E. 1995. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. J. Biol. Chem. 270, 29386-91.

Ryves JW und Harwood AJ. 2001. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. Biochem. Biophys. Res. Comm. 280, 720-25.

Salvesen GS und Dixit VM. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10964-7.

Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol.Today 14 (3), 131-6.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. 17, 1675-78.

Schotte P, van Loo G, Carpentier I, Vandenabeele P, Beyaert R. 2001. Lithium sensitizes tumor cells in an NF-kappa B-independent way to caspase activation and apoptosis induces by tumor necrosis factor (TNF). Evidence for a role of the TNF receptor-associated death domain protein. J. Biol. Chem. 276(28), 25939-45.

Schwabe RF und Brenner AD. 2002. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and apoptosis in hepatocytes, 2002. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G204-11.

Seidensticker MJ und Behrens J. 2000. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1495, 168-82.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.

Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 1, 469-74.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-57.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 1999. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067-74.

Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signaling in intact cells. *Curr Biol.* 6, 1664-68.

Sun A, Shanmugam I, Song J, Terranova PF, Thrasher JB, Li B. 2007. Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNS interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer. *Prostate* 67(9), 976-88.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-6.

Tan J, Zhuang L, Leong H-S, Iyer NG, Liu ET, Yu Q. 2005. Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  promotes p53-dependent apoptosis through a direct bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 65(19), 9012-20.

Thornberry NA und Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.

Turenne GA und Price BD. 2001. Glycogen synthase kinase 3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol* 2:12.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Durling thr p53 network. *Nature* 408, 307-10.

Vogt Sionov R, Hayon LI, Haupt Y. 2001. The regulation of p53 growth suppression. In *Cell Cycle Checkpoints and Cancer*, 106-25.

- Vousden KH. 2000. p53: death star. *Cell* 103(5), 691-4.
- Vousden KH und LuX. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 594-604.
- Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewski A, Chen X, Johnson GV, Jope RS. 2002. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and p53 after DNS damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7951-55.
- Watcharasit P, Bijur NG, Song L, Zhu J, Chen X, Jope SR. 2003. Glycogen synthase kinase-3  $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) binds to and promotes the actions of p53. *J. Biol. Chem.* 278, 48872-79.
- Weinberg RA. 1997. The cat and mouse games that gens, viruses, and cells play. *Cell* 88, 573-75.
- Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT, Proud CG. 1998. Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett.* 421, 125-30.
- Welsh GI und Proud CG. 1993. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem. J.* 294, 625-29.
- Woodgett JR. 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-38.
- Woodgett JR, 1991. cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods Enzymol.* 200, 564-77.
- Woodgett JR und Cohen P. 1984. Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochem. Biophys. Acta* 788, 339-47.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.
- Yao HB, Shaw PC, Wong CC, Wan DC. 2002. Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. *J. Chem. Neuroanat.* 23, 291-7.
- York JD, Ponder JW, Majerus PW. 1995. Definition of a metal-dependent/Li(+)-inhibited phosphomonoesterase protein family based upon a conserved three-dimensional core structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5149-53.
- Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Momoi T, Srinivasan A, Nicholson DW, Lazebnik Y, Flavell RA. 2000. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat. Med.* 6, 1241-7.